

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES DE SYSTÉMATIQUE BACTÉRIENNE

IX. — ESSAI DE CLASSIFICATION DES BACTÉRIES PHYTOPATHOGÈNES ET ESPÈCES VOISINES

par J. MAGROU et A.-R. PRÉVOT.

(Institut Pasteur. Services de Phytopathologie et des Anaérobies.)

La nécessité de supprimer, pour cause d'homonymie, le terme générique *Phytomonas* Bergey 1923 (1), a comme première conséquence d'obliger les taxonomistes à reclasser les 137 espèces phytopathogènes qu'il comprenait. Si ce terme générique avait été correctement défini, il eût suffi de trouver un autre nom générique pour le remplacer purement et simplement. Malheureusement, l'absence de précision dans la définition de *Phytomonas* avait permis de grouper sous ce vocable les espèces les plus dissemblables : mobiles et immobiles, Gram-positives et Gram-négatives, incolores et pigmentées. Ces faits s'ajoutaient, par ailleurs, à l'imprécision et à l'hétérogénéité des autres groupes de bactéries phytopathogènes et c'est une révision complète de ces bactéries qui est devenue maintenant indispensable. Plusieurs systématiciens en avaient senti depuis longtemps la nécessité et avaient proposé des solutions partielles. Ainsi, en 1936, Kluyver et Van Niel [1] avaient individualisé la tribu des *Pseudomonadæ*

(1) En 1909, Donovan avait en effet proposé le même terme pour un Flagellé. Or, le Code International de Nomenclature bactérienne qui a été élaboré par le Comité International de Nomenclature et publié dans ces *Annales*, 1948, 74, 271, interdit les homonymies entre genres bactériens et protistologiques.

pour rassembler les bactéries Gram-négatives mobiles ou non, du sol et des eaux, dont beaucoup sont pathogènes pour les plantes.

En 1939, Dowson [2] a proposé le genre *Xanthomonas* pour les espèces mobiles formant des colonies jaunes à pigment insoluble dans l'eau, espèce-type *X. hyacinthi*.

En 1942, Conn [3] définit le genre *Agrobacterium* pour les espèces mobiles Gram-négatives incolores, parasitant les racines et tiges en y produisant des hyperplasies, espèce-type *A. tumefaciens*.

Nous-mêmes, en 1948 [4], avons proposé un nouveau genre : *Phytobacterium*, pour grouper la plupart des espèces ex-*Phytomonas* : mobiles, asporulées, Gram-négatives, pourvues d'un ou plusieurs cils polaires, formant des colonies blanches et pathogènes pour les plantes : espèce-type, *Ph. fabae*. Nous avons également défini sa position au sein de la tribu des *Pseudomonadaceæ*.

Mais ce travail ne résolvait pas complètement le problème de la systématique des bactéries phytopathogènes, en particulier laissait irrésolue la question des espèces phytopathogènes Gram-positives. Nous allons essayer ici d'esquisser une systématique cohérente, logique et homogène de ce groupe si important. Nous nous inspirerons, pour cela, des principes qui ont permis à l'un de nous de résoudre la systématique des bactéries anaérobies, dont la plupart des groupes ont été, par la suite, admis par un grand nombre de bactériologistes [5] et qui ont pu être appliqués à des groupes aérobies [6].

Le premier principe permettant de mettre de l'ordre dans ce groupe est celui qui exige l'homogénéité cytochimique des familles. Les *Pseudomonadaceæ* ayant pour genre-type *Pseudomonas* sont des bactéries exclusivement Gram-négatives, et ce principe ne peut souffrir aucune exception. Le deuxième principe qui nous guide est celui de l'homogénéité structurale des genres qui ne doivent comprendre que des espèces semblables toutes mobiles ou toutes immobiles. Enfin une troisième considération d'ordre écologique, nous incite à retirer le genre *Erwinia* de la famille des *Enterobacteriaceæ*, puisque c'est un genre comprenant des espèces phytopathogènes du sol et des eaux, mais non de l'intestin.

Voici donc notre nouvelle conception de la famille des *Pseudomonadaceæ* :

Pseudomonadaceæ (Winslow et al.) emend.

Définition : Bâtonnets asporulés ; droits ou incurvés ; Gram-négatifs. Formes pseudoramifiées dans le genre *Mycoplana*. Quand ils sont mobiles, cil polaire unique ou en touffes ; rarement péritriches. Quelques espèces immobiles (*Aplanobacter*). Poussant

bien à la surface des milieux de culture ordinaires. Aérobie facultatif. Sol et eau. La plupart pathogènes pour les plantes et quelques-uns pour les animaux.

Comprend trois tribus :

Tribu I. — *Pseudomonadæ* (Kluyver et Van Niel) emend.

Définition : Formes droites, asporulées, Gram-négatives, mobiles par cils polaires, ou immobiles ; sol et eau ; la plupart pathogènes pour les plantes. Beaucoup sont pigmentées.

Six genres dont le type est *Pseudomonas* et un sous-genre.

Genre I. — *Pseudomonas* (Migula) emend.

Bâtonnets monotriches ou lophotriches, asporulés ; Gram-négatifs. Pigmentés, fluorescents. Pigment bleu vert hydrosoluble. Fermente fréquemment le glucose, parfois avec gaz visible. Ne fermente pas le lactose. Nitrates réduits en nitrites, en NH_3 ou en N libre.

Quelques espèces attaquent les graisses et les hydrates de carbone. Sol ; eau. La plupart pathogènes pour les plantes ; quelques-unes pour les animaux. Quelques espèces marines.

Espèce-type. — *Pseudomonas fluorescens* (Flügge) Migula.

Ce genre comprend en outre les espèces phytopathogènes : *P. aleuritidis*, *P. angulata*, *P. aptata*, *P. atrofaciens*, *P. barkeri*, *P. berberidis*, *P. wieringæ*, *P. bowlesiae*, *P. cerasi*, *P. cichori*, *P. coronafaciens* et var. *atropurpurea*, *P. delphinii*, *P. endiviae*, *P. erodii*, *P. gladioli*, *P. glycinea* et var. *japonica*, *P. hibisci*, *P. holci*, *P. intybi*, *P. apii*, *P. lachrymans*, *P. levistici*, *P. maculicola*, *P. marginalis*, *P. marginata*, *P. martyniae*, *P. medicaginis* et var. *phaseolicola*, *P. mellea*, *P. nectarophila*, *P. panacis*, *P. papulans*, *P. pisi*, *P. polycolor*, *P. pseudo-zoogloeae*, *P. punctulans*, *P. savastoni* et var. *fraxini*, *P. sesami*, *P. solanacearum*, *P. spongiosa*, *P. striafaciens*, *P. syringae*, *P. tabaci*, *P. tolaasi*, *P. tomato*, *P. tonelliana*, *P. trifoliorum*, *P. vignae* et var. *leguminophila*, *P. viridiflava* et var. *concentrica*, *P. viridilivida*, *P. xanthochlora*, *P. betæ-gelatae* [7] ; *P. aceris*, *P. alliicola*, *P. ananas*, *P. asplenii*, *P. calendulae*, *P. caryophylli*, *P. cumini*, *P. gardeniae*, *P. lapsa*, *P. ligustri*, *P. primulae*, *P. ribicola*, *P. rimae-faciens*, *P. setariae*, *P. viburni*.

Genre II. — *Phytobacterium* Magrou et Prévot, 1948.

Bâtonnets Gram-négatifs, asporulés, mobiles, pourvus d'un cil polaire unique ou de plusieurs cils polaires, formant des colonies blanches. Pathogènes pour les plantes.

Espèce-type. — *Phytobacterium fabæ*.

Ce genre comprend en outre les espèces : *P. alboprecipitans*, *P. andropogoni*, *P. cannæ*, *P. castaneæ*, *P. destructans*, *P. helianthi* et var. *tuberosi*, *P. petasites*, *P. astragali*, *P. cattleyæ*, *P. colurnæ*, *P. eriobotryæ*, *P. iridicola*, *P. lignicola*, *P. maublancii*, *P. panici-miliacei*, *P. passifloræ*, *P. stizolobii*, *P. saliciperda*, *P. woodsii*, *P. zingiberi*, *P. vitrosum* [8].

Genre III. — *Agrobacterium*, Conn 1942.

Petits bâtonnets asporulés, Gram-négatifs, mobiles, 1 à 4 cils péritriches (2) [si un seul cil, implantation latérale ou polaire]. Pas de gaz visible ni d'acidité au tournesol sur milieu de culture ordinaire. En milieu synthétique, production de CO_2 en assez grande quantité pour virer le bleu de bromothymol et parfois le rouge de bromocrésol. Gélatine liquéfiée lentement ou non. Azote libre non fixé. Azote inorganique des nitrates ou de NH_3 peut être utilisé. Température optimum 25 à 30°.

Habitat : Sol ; racines ou tiges des plantes sur lesquelles ils produisent des hyperplasies.

Espèce-type : *A. tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn et trois autres espèces : *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. pseudotsugæ*.

Genre IV. — *Xanthomonas*, Dowson 1939.

Bâtonnets asporulés, Gram-négatifs, mobiles, monotriches. Pigment jaune insoluble dans l'eau. Protéines rapidement digérées. Lait alcalinisé. SH^2 . Asparagine insuffisante comme source unique d'N et C. Acides produits à partir des mono- et disaccharides. Pathogène pour les plantes chez lesquelles ils produisent de la nécrose.

Espèce-type. — *X. hyacinthi* (Wakker) Dowson.

et 54 autres espèces : *X. albilineans*, *X. alfalfæ*, *X. antirrhini*, *X. beticola*, *X. campestris*, *X. campestris* var. *armoraciæ*, *X. carotæ*, *X. celebensis*, *X. citri*, *X. conjaci*, *X. cucurbitæ*, *X. fici*, *X. flava-begoniæ*, *X. glycines*, *X. gypsophilæ*, *X. gummisudans*, *X. hederæ*, *X. heterocea*, *X. holcicola*, *X. itoana*, *X. juglandis*, *X. malvacearum*, *X. nigromaculans*, *X. oryzæ*, *X. papavericola*, *X. pelargonii*, *X. phaseoli*, et var. *sojensis*, *X. pruni*,

(2) Depuis le travail de Conn, des photomicrographies électroniques ont montré une implantation plutôt polaire [14].

X. radiciperda, *X. ricinicola*, *X. rubefaciens*, *X. rubrilineans*, *X. suberfaciens*, *X. translucens*, *X. vesicatoria*, *X. vitians*, *X. acernea*, *X. barbareæ*, *X. begoniæ*, *X. corylina*, *X. dieffenbachia*, *X. flavozonata*, *X. geranii*, *X. incanæ*, *X. lactucæ*, *X. lactucæ-scarioria*, *X. lespedeza*, *X. maculifolium-gardenia*, *X. manihotis*, *X. nakata*, *X. phormicola*, *X. plantaginis*, *X. rubrisubalbicans*, *X. tardicrescens*, *X. vignicola*.

Du genre *Xanthomonas*, nous rapprochons le sous-genre *Cellulomonas* Bergey et al. 1923, dont presque toutes les espèces sont pigmentées en jaune, et dont la seule différenciation physiologique importante est l'existence, dans leur équipement enzymatique, d'une cellulase. Ce sont les cellulolytiques aérobies des végétaux. Ce genre, primitivement placé par Bergey parmi les *Pseudomonadaceæ*, a été déplacé à tort par ses successeurs et figure dans la 6^e édition du *Bergey's Manual* comme un sous-genre du genre *Bacterium*. Or, le genre *Bacterium* est Gram-positif et ne peut donc pas comprendre un sous-genre Gram-négatif. Prévot [9] avait provisoirement rétabli sa position au sein des *Pseudomonadaceæ* en annonçant la révision exposée dans le présent travail.

Sous-genre. — *Cellulomonas*, Bergey et al. 1923.

Bâtonnets de petite taille à extrémités arrondies ; asporulés, Gram-négatifs ; mobiles par cils péritriches ; sol ; cellulolytique ; croissance peu vigoureuse sur milieux ordinaires. Beaucoup sont pigmentés en jaune.

Espèce-type. — *C. biazotea* (Kellerman et al.) Bergey et al.

Autres espèces : *C. aurogenes*, *C. galba*, *C. rossica*, *C. folia*, *C. flava*, *C. allasea*, *C. bibula*, *C. lugis*, *C. concita*, *C. coesia*, *C. gilva*, *C. ferruginea*, *C. albida*, *C. alma*, *C. desidiosa*, *C. pusilla*, *C. gelida*.

(Cette définition élimine de ce genre les espèces immobiles qui lui étaient rattachées à tort, et que nous reportons à *Aplanobacter*.)

Genre V. — *Erwinia*, Winslow et al.

Bâtonnets asporulés Gram-négatifs, mobiles, cils péritriches. Nécessitent azote organique. Fermentent divers glucides dont le glucose et souvent le lactose, avec acidification et production ou non de gaz. Pathogènes pour les plantes dont ils envahissent les tissus, y provoquant de la nécrose sèche, des galles, des pourritures molles et des flétrissures. Dans ce dernier cas, une protopectinase détruit la substance lamellaire intermédiaire.

Espèce-type. — *E. amylovora*.

Autres espèces : *E. ananas*, *E. aralivora*, *E. aroidea*, *E. betivora*, *E. cacticida*, *E. carotovora*, *E. croci*, *E. dahliæ*, *E. edgeworthiæ*, *E. erivanensis*, *E. flavida*, *E. ixixæ*, *E. lathyri*, *E. mangifera*, *E. melonis*, *E. papaveris*, *E. papayæ*, *E. phytophthora*, *E. sacchari*, *E. solanisapra*, *E. tracheiphila*, *E. rhapsodici*, *E. salicis*, *E. atro-septica*, *E. cassavæ*, *E. cytolytica*, *E. nimipressuralis*, *E. vitivora*.

Genre VI. — *Aplanobacter* (E. F. Smith, 1905) emend.

Bâtonnets asporulés, Gram-négatifs, immobiles, non ciliés ; pathogènes pour les plantes.

Espèce-type. — *A. stewarti*.

Autres espèces : *A. betlis*, *A. cepivorum*, *A. dissolvens*, *A. insidiosum*, *A. maculicola*, *A. rhizoctonia*, *A. magroui* [12], *A. idoneum*, *A. flavigenum*, *A. ligatum*, *A. pini*, *A. udum*, *A. lucrosum*, *A. acidulum*, *A. castigatum*, *A. agropyri*, *A. cissicola*, *A. maculicola*, *A. robici*.

Tribu II. — *Achromobactereæ*, nouv. trib.

Définition : *Pseudomonadaceæ* incolores ; non pathogènes pour les plantes.

Cette tribu comprend les genres suivants :

Genre I. — *Achromobacter*, Bergey et al. 1923.

Bâtonnets asporulés Gram-négatifs, mobiles par cils péritriches ; non pigmentés. Sol et eau.

Espèce-type. — *A. liquefaciens*.

Autres espèces : *A. thalassius*, *A. ioplagus*, *A. delicatulum*, *A. aquamarinum*, *A. cycloclastes*, *A. superficiale*.

Genre II. — *Mycoplasma*, Gray et Thornton 1928.

Bâtonnets asporulés Gram-négatifs, mobiles. Quelques formes pseudo-ramifiées. Capables d'utiliser un composé aromatique tel que phénol comme source d'énergie. Sol.

Espèce-type. — *M. dimorpha*.

Autre espèce : *M. bullata*.

Tribu III. — *Chromobactereæ*, Prévot 1948 [10].

Définition : *Pseudomonadaceæ* pigmentées, non pathogènes.
4 genres.

 Genre I. — *Chromobacterium*, Bergonzini 1881.

Bâtonnets asporulés, Gram-négatifs, mobiles soit par cils polaires, soit par cils péritriches ; aérobies, produisant pigment violet soluble alcool et insoluble chloroforme. Eau et sol.

Espèce-type. — *C. violaceum*.

Autres espèces : *C. ianthinum*, *C. amethystinum*.

 Genre II. — *Flavobacterium*, Bergey et al. 1923.

Bâtonnets asporulés, Gram-négatifs de taille moyenne. Mobiles ; cils péritriches ; pigment jaune ou orange. Attaquant faiblement les glucides. Fermentation acide mais non gazeuse des hexoses. Sol et eau.

Espèce-type. — *F. aquatile*.

Autres espèces : *F. okeanokoites*, *F. rigense*, *F. devorans*, *F. marinotypicum*, *F. marinovirosum*, *F. halohydrium*, *F. neptunium*, *F. rhenanus*, *F. harrisonii*, *F. invisible*, *F. lactis*.

 Genre III. — *Protaminobacter*, Den Dooren de Jong 1926.

Bâtonnets asporulés Gram-négatifs, mobiles, poussant faiblement sur milieux ordinaires et sur gélose peptonée ; capables d'attaquer une ou plusieurs alkylamines inférieures et spécialisés

dans l'attaque des substances contenant le groupe $\text{HN} \begin{matrix} \swarrow \text{C} \\ \searrow \text{C} \end{matrix}$.

Espèce-type. — *P. rubrum*.

 Genre IV. — *Serratia*, Bizio.

Bâtonnets asporulés Gram-négatifs, de petite taille, mobiles, cils péritriches, produisant pigment rouge ou rose sur gélose ou gélatine. Liquéfiant rapidement la gélatine. Réduisant les nitrates. Coagulant puis digérant le lait. Produisent CO_2 et H_2 , acides acétique, formique, lactique et succinique ; acétylméthylcarbinol et 2-3-butylène-glycol.

Espèce-type. — *S. marcescens*.

Autres espèces : *S. indica*, *S. plymuthicum*, *P. kilensis*, *P. piscatorum*.

Telle est la systématique que nous proposons pour les *Pseudomonadaceæ*. La tribu II que lui adjoignent les auteurs de la 6^e édition du *Bergey's Manual* [11], soit les *Spirilleæ* (Kluyver et Van Niel), est considérée par Prévot [10] comme un ordre : les *Spirillales*, comprenant deux familles : les *Vibrionaceæ* et les *Spirillaceæ*.

Cette systématique, entre autres conséquences, élimine les bâtonnets Gram-positifs de la famille des *Pseudomonadaceæ*. Ceux-ci doivent donc être répartis dans les genres naturels auxquels ils appartiennent, car le caractère physiologique : phytopathogène, n'est pas de nature à autoriser la création de genres morphologiquement hétérogènes. C'est ainsi que nous répartirons :

1° Les espèces asporulées, Gram-positives, mobiles dans le genre *Bacterium* Ehrenberg emend, soit : *B. cypripedii*, *B. lilii*, *B. flaccumfaciens*, *B. hypertrophicans*, *B. melophthora*, *B. proteamaculans*, *B. pruricola*, *B. seminum*, *B. tritici*, *B. viciae*, *B. poinsettiae*.

2° Les espèces asporulées Gram-positives, immobiles dans le genre *Eubacterium* Janke 1930 emend, soit : *E. asterocearum*, *E. teutlia*.

3° Les espèces asporulées Gram-positives, immobiles, à morphologie de Corynébactéries dans le genre *Corynebacterium*, soit : *Corynebacterium michiganense*, *C. rathayi*, *C. sepedonicum*, *C. fascians*.

*
**

Le genre *Rhizobium*, en tant que cécidogène, a été rapproché par Breed, Murray et Hitchens 1948 [11] des phytopathogènes et en particulier des *Agrobacterium*. Mais les *Rhizobium* sont des bactéries symbiotiques utiles à la plante par fixation d'azote. Bien que, selon l'un de nous [13], la symbiose ne représente qu'un cas limite de l'infection, nous estimons que le caractère spécial du parasitisme des *Rhizobium* justifie leur classement dans un autre groupe. Aussi suivrons-nous la proposition de Prévot [10] qui les a classés avec les *Protobacteriaceæ*.

ESPÈCES INCERTAINES.

Reste un nombre important d'espèces incertaines, soit que leur morphologie ait été insuffisamment décrite, soit que leurs carac-

tères physiologiques soient douteux. Il est actuellement impossible de les situer exactement et, tant que de nouveaux travaux n'auront pas précisé tout ce qui est douteux ou incertain en elles, nous ne pouvons indiquer leur position exacte.

Telles sont : *Erwinia nelliæ*, *E. papayæ*, *E. scabiegena*, *E. citrimaculans*, *Xanthomonas beticola*, *X. fici*, *X. flava begoniæ*, *Pseudomonas matthiolæ*, *P. musæ*, *P. oncidii*, *Xanthomonas vasculorum*, *X. vesicatoria*.

CONCLUSION.

1° L'illégitimité du genre *Phytomonas*, jointe à l'hétérogénéité des groupes antérieurement proposés pour les bactéries phytopathogènes et les autres *Pseudomonadaceæ* nécessitent une refonte de la taxonomie de ces bactéries.

2° Nous proposons une nouvelle classification se résumant dans le tableau synoptique suivant :

Famille des <i>Pseudomonadaceæ</i> .	Tribu I. <i>Pseudomonadaceæ</i> . K. et V.	Genre I. <i>Pseudomonas</i> , type <i>Ps. fluorescens</i> .
		Genre II. <i>Phytobacterium</i> , type <i>Ph. fabæ</i> .
		Genre III. <i>Agrobacterium</i> , type <i>A. tumefaciens</i> .
		Genre IV. <i>Xanthomonas</i> , type <i>X. hyacinthi</i> .
		Sous-genre. <i>Cellulomonas</i> , type <i>C. biozotea</i> .
		Genre V. <i>Erwinia</i> , type <i>E. amylovora</i> .
	Tribu II. <i>Achromobactereæ</i> n. tribu.	Genre VI. <i>Aplanobacter</i> , type <i>A. stewarti</i> .
		Genre I. <i>Achromobacter</i> , type <i>A. liquefaciens</i> .
		Genre II. <i>Mycoplana</i> , type <i>M. dimorpha</i> .
		Genre I. <i>Chromobacterium</i> , type <i>Ch. violaceum</i> .
		Genre II. <i>Flavobacterium</i> , type <i>Fl. aquatile</i> .
		Genre III. <i>Protaminobacter</i> , type <i>P. alboflavum</i> .
	Tribu III. <i>Chromobactereæ</i> Prévot.	Genre IV. <i>Serratia</i> , type <i>S. marcescens</i> .

3° Les espèces Gram-positives, éliminées par cette homogénéisation des groupes Gram-négatifs, sont réparties dans les genres *Bacterium*, *Eubacterium* et *Corynebacterium*.

4° Les espèces incertaines restent en position d'attente jusqu'au moment où les caractères incertains seront précisés par une nouvelle expérimentation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KLUYVER et VAN NIEL. *Cf. B. II*, 1936, **94**, 397.
- [2] DOWSON. *Cf. B. II*, 1939, **100**, 177.
- [3] CONN. *J. Bact.*, 1942, **44**, 353.
- [4] MAGROU (J.) et PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 1229.
- [5] PRÉVOT (A.-R.). *Ann. des Sci. Nat.*, 1933, **15**, 23 ; ces *Annales*, 1938, **60**, 285 ; 1938, **61**, 72 ; 1940, **64**, 117 ; 1941, **67**, 87 ; 1946, **72**, 2.
- [6] TCHAN (Y. T.), POCHON (J.) et PRÉVOT (A.-R.). Ces *Annales*, 1948, **74**, 394.
- [7] DELAPORTE (M^{lle} B.) et BELVAL (H.). Ces *Annales*, 1947, **73**, 862 et *C. R. Acad. Sci.*, 1944, **218**, 854 ; 1945, **221**, 532 ; 1946, **222**, 1011 ; 1947, **224**, 847.
- [8] DELAPORTE (M^{lle} B.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, sous presse.
- [9] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de Class. des Anaérobies*. Masson, 1948, 2^e éd., 15.
- [10] *Id.*, p. 16 et p. 20.
- [11] *Bergey's Manual of Deter. Bact.*, 6^e édit., 1948.
- [12] MARIAT. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 115.
- [13] MAGROU (J.). Les maladies des végétaux. *Expansion Scientif. franç.*, 1948.
- [14] BRAUN (A. C.) et ELROD (R. B.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 695.

Autres publications ayant servi à la rédaction de ce mémoire :

- GAUMANN et DODGE. *Comparative morphology of fungi*. McGraw-Hill, N.-Y. et Londres, 1928.
- PINCHARD. *J. agric. Res.*, 1935, **50**, 933.
- TAKIMOTO. *Ann. phytopath. Soc. Japan*, 1939, **9**, 43.
- HANSEN et SMITH. *Hilgardia*, 1937, **10**, 569.
- TILFORD. *J. Agric. Res.*, 1936, **53**, 383.
- STARR et PIRONE. *Phytopath.*, 1942, **32**, 1080.
- CHESTER. *Phytopath.*, 1938, **28**, 431.
- BACCARINI. *Bull. Soc. Bot. Ital.*, 1894, 235.
- TAKIMOTO. *J. Plant. Protect.*, 1930, **17**, 732.
- THORNBERG et ANDERSON. *Phytopath.*, 1937, **27**, 946.
- BURKHOLDER. *Phytopath.*, 1942, **32**.
- ELROD et BRAUN. *J. Bact.*, 1947, **53**, 509.
- STARR. *J. Bact.*, 1946, **51**, 131.
- ELLIOTT. *Phytopath.*, 1937, **27**, 1181.

L'ANALYSE IMMUNOCHIMIQUE QUALITATIVE MÉTHODE PAR DIFFUSION DES ANTIGÈNES AU SEIN DE L'IMMUNSÉRUM PRÉCIPITANT GÉLOSÉ (*)

[DEUXIÈME PARTIE] (1)

par JACQUES OUDIN

(Institut Pasteur. Service de Chimie Microbienne.)

IV. — Systèmes précipitants complexes.

DÉFINITION. — Nous désignons ainsi tout système précipitant comportant plusieurs antigènes (2) et tel qu'à l'égard des anticorps avec lesquels ces antigènes réagissent (3), les spécificités des différents antigènes ne soient ni identiques, ni totalement différentes les uns des autres.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 8 juin 1948.

(1) Dans la première partie de ce mémoire, parue dans le précédent numéro [38], nous avons indiqué les buts de l'analyse immuno-chimique ; nous avons exposé le principe de la présente méthode (I) et décrit ses techniques (II) ; nous avons étudié les résultats que donne cette méthode dans le cas des systèmes précipitants simples [ceux où un seul antigène réagit] (III) : A, dans le système simple ovalbumine de Poule-immunsérum de Lapin, pris pour type (influence des principales variables sur l'aspect de la zone de précipitation, conditions d'apparition d'une zone dans le gel, causes d'erreur), B, dans six autres exemples de systèmes précipitants simples.

(2) Ici, comme dans l'ensemble de ce mémoire, nous appelons « antigènes précipitants », ou, plus simplement, « antigènes », les antigènes complets ou les haptènes qui donnent un précipité spécifique avec les anticorps.

(3) Cette précision est indispensable, car la spécificité des antigènes ne se manifeste que grâce à celle des anticorps : l'idée qu'une série d'antigènes puissent manifester la même spécificité avec un immun-sérum donné, ou des spécificités partiellement, mais non intégralement les mêmes (réactions croisées) avec un deuxième immun-sérum, ou des spécificités totalement différentes avec un troisième immun-sérum n'a rien de paradoxal ; elle est parfaitement concevable et sans doute réalisable au moyen d'antigènes semi-artificiels.

Il faudrait signaler ici un cas intermédiaire, en quelque sorte, entre les systèmes simples et les systèmes complexes ; ce serait celui où plusieurs antigènes, de spécificité identique à l'égard des anticorps avec lesquels ils réagissent, seraient cependant différents par quelque autre caractère. En se référant aux tracés microphotométriques de la première partie de ce mémoire, on remarque que, même sur ceux des figures 3 à 5 (où l'antigène est de l'ovalbumine) le maximum de densité de précipité ne paraît pas toujours coïncider avec la frontière ; si l'on admet pour valable l'explication que nous avons proposée de la différence de comportement entre les antigènes précipitants protéidiques et polyosidiques que nous avons étudiés, on ne peut exclure la possibilité, pour deux antigènes de même spécificité, mais de poids moléculaires différents et définis, de donner une image à deux frontières voisines, mais distinctes.

Les systèmes précipitants compris dans la définition ci-dessus seront, par ordre de complexité croissante :

1° Ceux dans lesquels tous les anticorps précipitables par l'un ou l'autre des antigènes du système peuvent être précipités par un seul de ces antigènes ; c'est, par exemple, le cas de plusieurs antigènes qui réagissent avec les anticorps homologues d'un seul d'entre eux.

2° Ceux dans lesquels aucun des antigènes du système ne peut précipiter tous les anticorps précipitables par les autres antigènes, une partie des anticorps étant cependant précipitable par n'importe lequel des antigènes du système ; c'est par exemple le cas de plusieurs antigènes qui ont en commun une partie de leur spécificité (4), et d'un immunosérum qui contient des anticorps homologues de tous les antigènes du système.

3° Ceux dans lesquels les antigènes (en nombre nécessairement supérieur à deux) sont tels qu'une partie de la spécificité de chacun d'eux est commune avec un ou plusieurs autres antigènes du système, mais non avec tous ; il n'existe donc pas, ici, d'anticorps qui puissent réagir avec n'importe lequel des antigènes du système. Ce serait, par exemple, le cas de plusieurs antigènes semi-artificiels, c'est-à-dire porteurs de groupements spécifiques artificiellement fixés sur leurs molécules (soit a, b, c, d... ces groupements différents), de telle sorte qu'on ait les antigènes ab, bc, cd..., et d'un immunosérum qui contiendrait des anticorps des spécificités a b c d... à l'exclusion de tout anticorps de spécificité éventuellement commune à tous les antigènes.

(4) Nous préférons cette manière de s'exprimer à celle, moins abstraite, qui fait intervenir la notion de groupements spécifiques, si difficile à définir dans le cas des antigènes naturels non modifiés de nature protéidique.

Il est vraisemblable que les combinaisons du troisième type ci-dessus sont rares ; peut-être même ne sont-elles réalisables qu'avec des antigènes semi-artificiels. Les combinaisons du deuxième type sont sans doute celles qu'on a le plus de chances de rencontrer dans la réaction d'un mélange naturel d'antigènes avec l'immunsérum obtenu à la suite de l'immunisation par le même mélange d'antigènes ; une réaction de cette sorte peut cependant réaliser un système du premier type (voir plus bas : deuxième exemple).

Nous nous limitons ici aux systèmes du premier type, dont nous étudierons deux exemples, comportant chacun deux antigènes, d'origine animale dans le premier exemple, d'origine bactérienne dans le deuxième exemple.

PREMIER EXEMPLE. — IMMUNSÉRUM ANTI-OVALBUMINE DE POULE ;
ANTIGÈNES : OVALBUMINE DE POULE (OP) ET DE CANE (OC).

Dans un système simple homologue, on peut logiquement admettre que dans la région de la colonne de gel comprise entre le maximum de densité de la zone de précipitation et l'interface (zone d'inhibition), les anticorps capables de précipiter avec l'antigène du système ne sont plus sous la forme libre ; la combinaison avec l'antigène en excès, dans laquelle ces anticorps sont engagés, rend impossible leur précipitation par le même antigène et, à plus forte raison, par un antigène hétérologue (5).

Il en résulte que, dans un système complexe tel que celui qui nous intéresse, toutes les fois qu'on observera deux zones distinctes, on devra rapporter à l'antigène homologue la zone la plus rapprochée de l'interface.

On pourrait être tenté de généraliser cette conclusion au cas où plusieurs antigènes hétérologues réagissent en même temps, en disant que l'ordre de parenté de ces antigènes avec l'antigène homologue sera celui dans lequel se présenteront leurs zones de précipitation en partant de l'interface. Le comportement des anticorps à l'égard des divers antigènes hétérologues dans des expériences d'épuisement réciproque en milieu liquide ne justifie pas une telle généralisation, puisqu'il a été observé (Landsteiner

(5) Il résulte de ceci que, dans un système précipitant multiple, lorsque l'épuisement de l'immunsérum par un antigène purifié A fait disparaître la zone la plus éloignée de l'interface sans modifier la densité des autres zones, on ne peut en conclure qu'il n'y a pas de réaction croisée entre l'antigène A et les autres antigènes, ainsi que nous avons conclu par erreur dans notre précédent travail ([15] p. 145, dernier alinéa) ; cette conclusion serait, au contraire, légitime si l'épuisement faisait disparaître la zone la plus rapprochée de l'interface, sans autre modification de l'image.

et Van der Scheer [39], que le comportement des anticorps varie avec les immunosérums ; cette généralisation aurait cependant quelques chances de se trouver vérifiée dans le cas des ovalbumines (de poids moléculaire sensiblement constant) ; les mêmes auteurs ont trouvé, en effet, que ces antigènes se présentaient dans un ordre sensiblement constant lorsque, dans leur réaction avec les différents immunosérums anti-ovalbumine de Poule, on les classait d'après l'abondance du précipité formé par chacun d'eux.

L'impossibilité, pour une zone hétérologue, de se trouver située entre la zone homologue et l'interface, a pour conséquence que la concentration initiale de l'antigène homologue exerce une influence sur la distance qui sépare la zone hétérologue de l'interface à un moment donné, et probablement aussi sur l'apparition d'une zone hétérologue bien individualisée et distincte de la zone homologue.

L'expérience montre qu'il en est ainsi :

EXPÉRIENCE. — Nous nous sommes servi d'un immunosérum qui contenait, par centimètre cube, environ 0,625 mg. d'azote d'anticorps précipitables par l'OP à l'équivalence, dont environ 0,190 mg. d'azote d'anticorps précipitables par l'OC à l'équivalence. Nous avons préparé plusieurs séries de tubes qui contenaient, pour la moitié du volume du gel, le sérum ci-dessus non modifié (gel S) ou épuisé (gel SE) par l'OC (à une dose légèrement supérieure à celle de l'équivalence) :

a) Dans deux séries de tubes, nous avons, au-dessus du gel S, réparti d'une part un mélange d'OP à la concentration initiale constante de 2,5 mg. d'azote par centimètre cube et d'OC à une concentration variant de 1/1 à 1/400 de celle d'OP ; d'autre part, des solutions d'OC seule à des concentrations variables (les mêmes que dans les mélanges précédents).

b) Dans deux séries de tubes contenant, l'une le gel S, l'autre le gel SE, nous avons réparti les mêmes mélanges d'OC à la concentration initiale constante de 2,5 mg. d'azote par centimètre cube et d'OP à une concentration variable de 1/1 à 1/200 de celle d'OC ; dans une troisième série de tubes qui contenaient du gel S, nous avons réparti des solutions d'OP seule à des concentrations initiales variables et égales aux concentrations d'OP dans les mélanges des deux séries précédentes.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Nous avons photographié les tubes après une évolution de sept jours à 26° environ ; les photographies de 17 de ces tubes sont reproduites sur les figures 7 et 8 de la planche I, respectivement pour les parties a et b ci-dessus de l'expérience ; les résultats de la comparaison des autres tubes figurent dans la discussion suivante :

a) *Conditions nécessaires à l'apparition d'une double zone ou d'une double frontière.* On a vu qu'en cas de double zone, la zone de l'antigène homologue était *a priori* la plus rapprochée de l'interface.

Pour qu'on observe deux zones ou deux frontières, il faut donc : 1° que la concentration de l'antigène hétérologue dans le mélange

(soit g'_M) ait, relativement à la concentration de l'antigène homologue dans le mélange (soit g_M), une valeur suffisante pour que les deux zones soient distinctes ; au-dessous de cette valeur minimale (soit g'_{M_0}), la zone unique aura le même maximum de densité (voir première partie de ce mémoire [38], p. 35) que dans la réaction de l'OP avec le gel S.

2° Que la concentration g_M de l'antigène homologue dans le mélange OP-OC soit supérieure à une valeur minimale (soit g_{M_0}) au-dessous de laquelle la précipitation de l'antigène homologue ne se produit pas dans le gel.

La comparaison des tubes de l'expérience décrite ci-dessus montre que, pour une valeur de $g_M = 2,5$ mg. d'azote par centimètre cube, la plus faible valeur de la concentration d'OC (dans le mélange OP-OC) compatible avec l'apparition d'une frontière d'OC, distincte de celle d'OP (g'_{M_0} comprise entre 2,5/20 et 2,5/40) est très supérieure à la concentration minimale d'OC, seule en solution, qui provoque une pénétration de la zone d'OC dans le gel (soit g'_0 cette valeur, qui est comprise entre 2,5/200 et 2,5/400) ; cette différence est évidemment imputable à la présence de la zone d'OP, dont la situation dans le gel à un moment donné est fonction de la concentration d'OP dans le mélange. g'_{M_0} est donc fonction de g_M .

La deuxième condition — pénétration d'une zone d'OP (homologue) dans le gel S — peut être étudiée par la comparaison des tubes de la deuxième partie de l'expérience (ci-dessus : b). Il résulte de cette comparaison que la concentration minimale d'OP (dans le mélange OP-OC) compatible avec la pénétration d'une zone d'OP dans le gel S (g_{M_0}) est inférieure à la concentration minimale d'OP, seule en solution, compatible avec la pénétration d'une zone dans le même gel S (g_0), et semble légèrement supérieure à la concentration minimale d'OP, dans le mélange OP-OC, compatible avec la pénétration d'une zone dans le gel SE (g_{ME_0}) : g_{M_0} est comprise entre 2,5/100 et 2,5/200 ; g_{ME_0} est comprise entre les mêmes valeurs mais semble, par extrapolation, légèrement inférieure à g_{M_0} ; g_0 est compris entre 2,5/40 et 2,5/100.

$$(1) \quad g_{ME_0} \leq g_{M_0} < g_0.$$

b) *Distance de la frontière hétérologue (OC) à l'interface en un temps donné.* Toutes les fois que la concentration d'OP dans le mélange OP-OC est suffisante pour entraîner la pénétration de la zone d'OP dans le gel S, la distance de la frontière d'OC à l'interface (soit h'_M) est plus grande que la distance de la frontière d'OC à l'interface dans la réaction de l'OC, seule en solution à la même concentration, avec le même gel S (soit h') :

$$(2) \quad \text{pour } g_M > g_{M_0}, \quad h' < h'_M.$$

La distance h'_M est donc fonction, non seulement de la concentration g'_M d'OC, directement responsable de la zone, mais aussi de la concentration g_M de l'antigène homologue OP dans le mélange ; elle est, naturellement, une fonction croissante de ces deux variables.

c) *Distance de la frontière homologue à l'interface en un temps donné.* Toutes les fois qu'on observe deux frontières distinctes dans la réaction du mélange OP-OC avec le gel S, la distance de la frontière

d'OP à l'interface (soit, dans ce cas h_M) est plus petite que la distance de la frontière d'OP à l'interface dans la réaction du mélange OP-OC avec le gel SE (soit h_{ME}), et plus grande que la distance de la frontière d'OP à l'interface dans la réaction de l'OP, seule en solution à la même concentration que dans le mélange ci-dessus, avec S (soit h).

$$(3) \quad h < h_M < h_{ME} \quad (6).$$

Lorsque, du fait de la valeur trop faible de la concentration d'OC dans le mélange OP-OC qui réagit avec S, on n'observe une seule frontière (soit $g'_M < g'_{M_0}$; ici, $g'_M < \frac{g_M}{40}$), la distance de cette frontière unique à l'interface (soit h_M) est la même que dans la réaction d'OP, seule en solution, avec S (soit h):

$$(4) \quad \text{pour } g'_M < g'_{M_0}, \quad h_M = h.$$

Nous avons signalé qu'*a priori*, lorsqu'on observe, pour l'antigène hétérologue, une zone distincte de celle de l'antigène homologue, les anticorps libres que rencontre l'antigène homologue dans sa diffusion sont ceux seuls qu'il rencontrerait s'il réagissait seul avec l'immunsérum préalablement épuisé par l'antigène hétérologue; les inégalités (1) et (3), qui traduisent les résultats de l'expérience, montrent que le comportement de la zone homologue n'est pourtant pas, dans ce cas, quantitativement semblable à celui qu'elle aurait dans la réaction avec le sérum épuisé, en ce qui concerne: 1° la concentration minimale d'antigène homologue suffisante pour entraîner l'apparition d'une zone homologue; 2° la distance de la frontière homologue à l'interface; l'une et l'autre ont, en effet, dans la réaction du mélange, une valeur intermédiaire entre celles qu'elles auraient: 1° si l'antigène homologue réagissait seul avec l'immunsérum non modifié; 2° si le même mélange des deux antigènes réagissait avec l'immunsérum épuisé par l'antigène hétérologue.

Nous avons, dans cette étude expérimentale sommaire du cas le plus simple de système complexe, laissé constante la composition du sérum en anticorps capables de précipiter avec l'un ou l'autre des deux antigènes. Une étude plus complète devrait être faite également en fonction de ces deux variables et comprendre

(6) Il faudrait encore tenir compte, dans la réaction du mélange (OP-OC) avec SE, de l'influence non spécifique de la présence d'OC, qui tend à augmenter la distance franchie par la zone d'OP (voir première partie du mémoire, p. 40). Soit h_E la distance de la frontière d'OP à l'interface dans la réaction de l'OP (seule en solution) avec SE; lorsque l'influence ci-dessus sera sensible, on aura: $h_E < h_{ME}$; une expérience complémentaire nous a confirmé que h_M est plus petit que h_E et que l'inégalité (3) doit être complétée de la manière suivante:

$$h < h_M < h_E < h_{ME}.$$

aussi le cas où l'immunsérum contient des anticorps homologues des différents antigènes (deuxième cas prévu après la définition), ce qui entraînerait, pour un système à deux antigènes, l'intervention de trois nouvelles variables au lieu de deux. On serait d'ailleurs limité, dans l'étude de ces nouvelles variables, par la composition des sérums tels que les fournit l'animal hyperimmunisé.

DEUXIÈME EXEMPLE. — IMMUNSÉRUM ANTI-ANTIGÈNE SOMATIQUE O DE *Eberthella typhosa* ; ANTIGÈNE SOMATIQUE ET HAPTÈNE POLYOSIDIQUE O DU MÊME BACILLE.

Outre l'origine des antigènes et le caractère imprécis des frontières de leurs zones, cet exemple diffère du précédent par le fait que le mélange des antigènes n'a pas été préparé artificiellement : nous avons utilisé, telle qu'elle se trouvait, une solution d'antigène somatique préparée selon la méthode de Boivin, I. Mesrobianu et L. Mesrobianu [35] et conservée pendant plus d'un an à la glacière ; une quantité appréciable de polyoside y était apparue (sous quelle influence, enzymatique ou autre ?).

D'autre part, l'un des deux antigènes précipitants mélangés est dépourvu, à lui seul, de tout pouvoir antigénique à l'égard du Lapin, en sorte que, même si les animaux avaient été immunisés par injection du même mélange, le haptène jouerait encore ici le rôle de l'antigène hétérologue. Ce rôle est d'ailleurs conforme aux observations de Hornus et Grabar [37] : le haptène glucidique ne précipite qu'une partie des anticorps précipitables par l'antigène complet.

Il ne semble donc pas y avoir de différence immunochemique essentielle entre ces deux exemples, pas même dans le fait que de très fortes concentrations de haptène inhibent la précipitation de l'antigène complet avec ses anticorps homologues (Grabar et Oudin [36]), puisque les observations de même nature avaient été faites par Landsteiner et Van der Scheer [39] sur des ovalbumines d'espèces différentes.

Pour les raisons déjà dites, la zone la plus éloignée de l'interface est celle du haptène (antigène hétérologue), ce qui est confirmé ici par l'aspect particulier de cette zone et sa similitude avec celui de la zone unique du haptène seul (planche I, fig. 9).

La très faible distance franchie par la zone de l'antigène complet et le caractère flou des limites inférieures des deux zones sont difficilement compatibles avec des observations précises ; d'ailleurs dans les cuves dont la photographie est reproduite figure 9, la concentration initiale du haptène seul (préparé par hydrolyse acétique) a été arbitrairement choisie (1 mg. par centimètre cube), la concentration initiale du haptène dans le mélange étant inconnue.

De ces deux exemples de systèmes précipitants complexes nous retiendrons essentiellement :

1° Que la zone de l'antigène hétérologue est plus éloignée de l'interface que celle de l'antigène homologue.

2° Que les facteurs qui régissent l'apparition et l'évolution de la zone unique des systèmes simples ne sont plus les seuls à intervenir dans les systèmes complexes ; l'apparition de la zone hétérologue dans le gel et la distance de sa frontière à l'interface sont, pour une part importante, fonctions de la concentration initiale de l'antigène homologue ; réciproquement, la présence de l'antigène hétérologue peut modifier d'une manière appréciable l'aspect, la densité de précipité, les conditions d'apparition de la zone homologue et l'espace franchi par sa frontière en un temps donné.

L'importance de cette influence mutuelle dépend, *a priori*, de la concentration des anticorps qui sont susceptibles d'être précipités indifféremment par l'un ou par l'autre des antigènes du système.

V. — Systèmes précipitants multiples.

DÉFINITION. — *Un système précipitant multiple est réalisé lorsque plusieurs systèmes précipitants simples ou complexes réagissent dans le même tube, les antigènes étant, au début de la réaction, réunis au sein de la même solution et les anticorps étant, d'autre part, réunis au sein du même immunsérum ou du même mélange d'immunsérums.*

Un immunsérum propre à réaliser un système multiple avec une solution donnée d'antigènes peut être celui qui a été prélevé chez l'animal : 1° à la suite de son immunisation par la même solution des mêmes antigènes ; 2° à la suite de l'immunisation par plusieurs des mêmes antigènes ; 3° à la suite de l'immunisation par des antigènes différents, mais parents de tous ou de plusieurs de ceux dont on étudie la précipitation (avec lesquels, par conséquent, l'immunsérum donne des réactions croisées) ; 4° il peut être, enfin, un mélange de plusieurs immunsérums contenant des anticorps qui donnent des réactions directes ou croisées avec plusieurs des antigènes, ou avec tous.

C'est d'un système précipitant multiple qu'il s'agira le plus souvent lorsqu'on fera réagir *in vitro* un liquide biologique doué de propriétés antigéniques, tel que la plupart des humeurs de l'organisme animal, ou un extrait bactérien non fractionné, avec un sérum précipitant prélevé chez l'animal à la suite de son immunisation par des injections répétées du même liquide.

L'étude des liquides antigéniques de cette nature est le but de la présente méthode ; nous lui demandons donc, sans sortir du domaine qualitatif :

1° De permettre, sans faire intervenir d'autres agents ni réactifs que les anticorps spécifiques et l'agar-agar, un dénombrement au moins approché (car on ne pourra jamais affirmer qu'il est complet) des antigènes d'un système multiple ;

2° De démontrer l'identité ou la parenté de la spécificité de l'un ou de plusieurs des antigènes ainsi réunis et dénombrés avec un ou plusieurs antigènes présents dans une autre solution (liquide biologique, fraction...).

EXEMPLE D'UN SYSTÈME PRÉCIPITANT MULTIPLE ARTIFICIELLEMENT RÉALISÉ. — Nous avons donné plus haut une idée des conditions nécessaires à l'apparition, dans le milieu gélifié contenant les anticorps, de la zone spécifique d'un système simple, et des conditions supplémentaires qui devaient être remplies pour que se séparent de la zone homologue les zones hétérologues d'un système complexe. Il nous reste à étudier expérimentalement dans quelle mesure plusieurs systèmes simples ou complexes, réunis dans un même tube, influent les uns sur les autres, et si de nouvelles conditions doivent être remplies pour qu'apparaissent et se séparent les zones qui apparaîtraient dans les divers systèmes simples ou complexes s'ils évoluaient séparément.

Limitant le présent travail à la méthode elle-même et à sa critique, nous avons, pour résoudre le problème ainsi posé, préparé un mélange de plusieurs antigènes dont le nombre, la nature et les concentrations étaient connus, réalisant, avec l'immunsérum approprié, un système précipitant multiple tel qu'il puisse être décomposé en plusieurs systèmes simples ou complexes susceptibles d'être étudiés séparément. Nous avons naturellement choisi les antigènes parmi ceux que nous avons déjà étudiés et nous avons, d'autre part, fait un mélange des immunsérums avec lesquels nous les avons fait réagir dans des systèmes simples ou complexes.

Nous avons donc préparé :

1° Un mélange des trois immunsérums de Lapin suivants : sérum anti-antigène somatique O de *E. typhosa* (55 p. 100 du volume du gel), sérum anti-ovalbumine de Poule (15 p. 100 du volume du gel), sérum anti-sérum de Cheval (riche notamment en anticorps spécifiques de l'albumine que nous faisons réagir à l'exclusion des autres antigènes du sérum de Cheval ; 15 p. 100 du volume du gel) ;

2° Un mélange des solutions des quatre antigènes précipitants suivants : polyoside O, ovalbumine de Poule, ovalbumine de Cane, albumine de sérum de Cheval (fraction T5, voir première partie du présent mémoire, p. 48) ; dans notre exemple de système multiple se trouvent donc réunis deux systèmes simples (polyoside O, albumine T5 et leurs sérums précipitants respectifs), et un système

complexe (ovalbumines de Poule et de Cane et sérum anti-ovalbumine de Poule).

Nous avons, d'autre part, préparé trois solutions dans lesquelles chaque antigène était à la même concentration que dans le mélange ci-dessus, et qui contenaient respectivement : du polyoside O (9 mg. par centimètre cube), de l'ovalbumine de Poule et de l'ovalbumine de Cane (0,45 et 0,15 mg. d'azote par centimètre cube), de l'albumine T5 (1 mg. par centimètre cube).

La photographie prise quatre jours après la répartition simultanée des quatre solutions d'antigène dans les quatre cuves, au-dessus du milieu gélifié de composition constante, est reproduite planche I, figure 10. L'aspect de chaque zone et la distance de sa frontière ou, à défaut de frontière précise (zone du polyoside), de son maximum de densité, à l'interface, n'y sont pas sensiblement modifiés par la coexistence, dans la même cuve, des zones spécifiques des autres antigènes. Nous avons vu que ceci n'est pas vrai des zones des deux ovalbumines, en raison de leur spécificité partiellement commune, lorsque ces deux antigènes réagissent séparément ou ensemble avec les mêmes anticorps que dans le présent système.

La généralisation, qui nous semble légitime, de ces observations, nous amène à conclure que :

Lorsque plusieurs antigènes précipitent simultanément dans le même tube avec des anticorps présents dans le gel, tout antigène tel que les anticorps qui précipitent avec lui ne précipite avec aucun autre des antigènes présents, réagit comme s'il était seul (7).

Une condition supplémentaire évidente est qu'aucune réaction, de quelque nature qu'elle soit, n'ait lieu entre les différents antigènes eux-mêmes (8).

(7) L'indépendance, l'un par rapport à l'autre, de plusieurs systèmes précipitants simples dont on a respectivement mélangé les antigènes et les anticorps, telle qu'ils réagissent tous ensemble comme si chacun d'eux était seul, ne se vérifie pas lorsqu'on étudie les systèmes précipitants par les méthodes de primo-floculation : Hooker et Boyd [18] ont fait réagir, au sein du même mélange, deux antigènes avec leurs anticorps respectifs, en faisant en sorte que leurs points de primo-floculation coïncident ; ils ont montré que le temps de floculation était alors diminué par rapport à ceux des réactions séparées des mêmes antigènes ; ils en tirent un argument en faveur de la non-spécificité de la deuxième phase (voir première partie du mémoire, note 3). D'autre part, Condrea et Poenaru [40], se servant de la méthode de Ramon, ont observé, dans la réaction simultanée de deux antigènes au sein du même mélange, que les points de primofloculation des antigènes étaient déplacés et que, lorsqu'il s'agissait de toxines, il n'y avait plus de parallélisme entre la primo-floculation et la neutralisation.

(8) Ni naturellement entre les différents anticorps, ce qui n'est guère à craindre s'ils appartiennent tous à la même espèce animale.

Un démenti apparent pourrait être donné à cette loi dans le cas où l'un ou plusieurs des antigènes du mélange seraient à des concentrations assez importantes pour exercer une influence non spécifique appréciable (9) sur la pénétration des zones des autres antigènes : en expérimentant, comme nous l'avons fait, on pourrait alors observer, pour certaines zones, une différence entre l'espace franchi par leur frontière dans le tube qui contient seulement l'antigène de leur système simple ou les antigènes de leur système complexe, et dans le tube qui contient tous les antigènes du système multiple. Cette influence non spécifique est négligeable dans l'expérience que nous avons présentée. Si elle était appréciable, il faudrait dissocier les systèmes simples et complexes réunis en un système multiple, non plus en séparant les antigènes mis à réagir avec le même mélange d'immunsérums, mais en séparant les immunsérums et en distribuant dans tous les tubes le même mélange d'antigènes ; on devrait alors s'assurer que l'influence non spécifique exercée par les divers milieux gélifiés sur la progression des zones est la même (9).

L'apparition des zones spécifiques n'est donc pas régie par d'autres lois, dans un système précipitant multiple, que dans les systèmes simples et complexes en lesquels il se décompose : le principe du dénombrement des antigènes reste le même que dans les systèmes simples et complexes ; les causes d'erreur et les moyens de les éliminer restent les mêmes.

Si, comme il nous paraît, le fait d'avoir, dans la précédente expérience, artificiellement mélangé les immunsérums, ne constitue pas une différence essentielle avec les conditions expérimentales qui se trouveront le plus souvent réalisées dans l'étude des systèmes précipitants multiples entreprise en vue du dénombrement des antigènes, les conclusions que nous avons tirées sont valables pour les systèmes précipitants multiples, quel que soit le nombre, connu ou inconnu, des antigènes qui y participent.

VI. — Conditions et possibilités d'application de la méthode.

Il résulte de ce qui précède que le nombre des antigènes contenus dans un mélange tel qu'un liquide biologique est supérieur ou égal au nombre des frontières ou des maximums de densité de précipité qu'on observe quand on fait réagir ce mélange avec un immunsérum quelconque qui donne, avec lui, un précipité spécifique. La probabilité d'une appréciation exacte du nombre des antigènes est *a priori* d'autant plus grande que l'immunsérum sera plus spécifique du liquide même qu'on étudie. Il peut cependant arriver qu'avec un mélange d'antigènes en nombre important,

(9) Voir plus haut : « Principaux facteurs qui influent sur la marche du phénomène » (première partie du mémoire, p. 40).

l'image fournie par un immunosérum très spécifique et très riche en anticorps soit d'une lecture difficile en raison de la densité et de l'étendue de certaines zones, inconvénient auquel on ne peut aisément remédier par la dilution de l'immunosérum, sans risquer que d'autres zones, naturellement moins denses, ne cessent d'être perceptibles.

Il nous faut attirer l'attention sur les conséquences de l'origine biologique des réactifs en présence et de la grande variabilité qui en résulte pour eux : les deux réactifs sont, ici, des mélanges, dont les constituants sont en proportions inconnues, mais variables avec l'origine individuelle de chaque mélange ; l'image d'un système multiple de cette nature ne sera donc exactement reproductible que si, dans les essais successifs, on fait réagir le même échantillon de liquide biologique avec le même échantillon d'immunosérum, en maintenant, bien entendu, constantes toutes les conditions qui peuvent varier au gré de l'expérimentateur.

A. — INFLUENCE DES PRINCIPALES VARIABLES SUR L'IMAGE FOURNIE PAR LES SYSTÈMES MULTIPLES.

TEMPS. — La variation du temps ne modifie pas sensiblement le maximum de densité de chaque zone, ni le rapport des distances respectives des diverses frontières à l'interface, dans les limites où la loi de proportionnalité de ces distances à la racine carrée du temps reste vérifiée, en sorte qu'à l'intérieur de ces limites, l'image se modifie au cours du temps comme si elle subissait un allongement tel que les distances des différentes frontières restent proportionnelles entre elles.

CONCENTRATION DES CONSTITUANTS DES DEUX RÉACTIFS. — a) *Anticorps*. — Nous savons que, pour chaque zone, le maximum de densité de précipité et la distance de la frontière à l'interface varient tous deux en fonction de la concentration des anticorps. Si l'on fait réagir, dans plusieurs tubes, le même échantillon de liquide biologique (concentration constante pour chaque antigène) avec des sérums d'animaux différents, immunisés de la même manière par le même mélange d'antigènes, c'est-à-dire avec des sérums qu'on suppose contenir qualitativement des anticorps des mêmes spécificités (mais à des concentrations différentes pour chacune, d'un sérum à l'autre), on ne possède aucun indice sûr qui permette, par la simple observation, de rapporter au même antigène telle zone d'un tube et telle zone d'un autre tube. La manière, différente selon les immunosérums, dont les diverses zones, même supposées en nombre constant, empiéteront les unes sur les autres, et se recouvriront éventuellement l'une l'autre, peut avoir pour conséquence que le dénombrement n'aboutisse pas, dans les divers tubes, au même résultat ; chaque dénombrement

ne donnant qu'un minimum, le nombre trouvé qui sera le plus élevé (après élimination des causes d'erreur) sera le plus rapproché du nombre d'antigènes cherché.

b) *Antigènes*. — Nous savons que le maximum de densité de chaque zone ne varie pas sensiblement en fonction de la concentration initiale de l'antigène. Lorsque plusieurs échantillons du même liquide biologique réagiront dans plusieurs tubes avec le même immunosérum à la même concentration, chaque antigène présent sous la même forme dans les différents échantillons donnera (si sa concentration est suffisante) naissance à une zone dont le maximum de densité sera sensiblement le même dans tous les tubes.

Si les zones sont en nombre relativement faible (par exemple, de deux à quatre) et constant dans tous les tubes, et s'il se trouve que leurs maximums de densité soient suffisamment différents, on pourra, dans les cas favorables, rapporter au même antigène, avec une faible probabilité d'erreur, les zones dont le maximum de densité aura la même valeur dans tous les tubes.

B. — IDENTIFICATION.

Les cas les plus intéressants auxquels la présente méthode peut être appliquée seront ceux où le nombre des antigènes est inconnu, non seulement dans l'échantillon, mais dans le liquide biologique lui-même qu'on étudie, envisagé d'une manière générale ; ceci implique que certains des antigènes qu'il contient n'ont pas été, jusqu'à ce jour, isolés à l'état de pureté, et il arrivera que ceux qui l'ont été soient l'exception ; tel est, en particulier, le cas des sérums. On ne saurait, alors, donner au mot « identification » son plein sens habituel que pour les antigènes qu'on peut obtenir à l'état pur et qu'on a pu ainsi soumettre à une étude chimique aussi précise et complète que le permettent les moyens actuels. L'identification à laquelle l'immunochimie peut prétendre est d'une nature différente, et plus biologique que chimique.

Elle peut consister à rapporter telle zone, apparue dans la réaction d'un liquide biologique avec l'immunosérum, à un antigène présent (à l'état pur ou non) dans une fraction.

Mais elle doit, surtout, consister à établir l'identité ou la parenté des antigènes d'une origine donnée avec des antigènes d'une autre origine. Des recherches de cette nature pourront parfois être effectuées sans purification ni fractionnement chimique préalable. Par cette voie, l'analyse immunochimique, capable de déceler, dans des liquides biologiques différents, des substances identiques ou parentes par leur spécificité, doit finalement fournir des renseignements utiles sur l'origine de ces substances dans l'organisme, même si l'isolement chimique de ces substances n'est pas encore possible.

TECHNIQUES D'IDENTIFICATION. — § 1. L'identification de l'antigène responsable d'une zone donnée d'un système multiple avec un antigène préparé d'autre part à l'état pur est généralement aisée : elle l'est également si l'on possède une préparation dans laquelle cet antigène seul peut précipiter avec l'immunsérum du système multiple, même si cette préparation contient d'autres substances, antigéniques ou non ; elle doit être possible si l'on possède un immunsérum ne contenant d'anticorps précipitants qu'à l'égard de cet antigène, à l'exclusion des autres antigènes du système multiple, même si l'immunsérum contient des anticorps spécifiques d'antigènes étrangers au système étudié.

§ 2. *Cas d'une solution S ne contenant qu'un seul antigène du système.* — Lorsqu'un des antigènes du système multiple se trouve, avec une spécificité identique et à une concentration suffisante, dans une solution ou préparation S ne contenant pas d'autre antigène du système, on dispose, pour identifier, dans l'image du système multiple, la zone qui doit lui être rapportée, des moyens suivants :

a) On épuise l'immunsérum du système multiple par la solution S ; on fait réagir comparativement le mélange d'antigènes avec l'immunsérum non modifié et avec l'immunsérum épuisé, tous deux à la même concentration dans le milieu gélifié ; la zone qui, présente dans l'un des deux tubes, sera absente de l'autre, sera la zone spécifique de l'antigène contenu dans S.

Ce que nous savons des systèmes complexes permet de comprendre que l'épuisement par un seul antigène puisse faire disparaître plusieurs zones.

b) On enrichit le mélange d'antigènes étudié, en lui ajoutant, en quantité suffisante, la solution S ; l'espace franchi en un temps donné par la zone spécifique de l'antigène contenu dans S sera augmenté par rapport au témoin (planche I, figure 11). Dans le cas où l'enrichissement a pour conséquence une augmentation importante, par rapport au témoin, de la concentration globale des substances dissoutes dans le mélange étudié, cet enrichissement peut entraîner aussi une augmentation de l'espace franchi dans le même temps par les autres zones mais toujours dans une moindre mesure.

Ce que nous savons des systèmes complexes permet de comprendre qu'un accroissement, d'origine spécifique, de l'espace franchi par plusieurs zones puisse avoir pour cause l'augmentation de la concentration d'un seul antigène.

§ 3. — *Cas d'un immunsérum ne contenant que les anticorps spécifiques d'un seul des antigènes du système.* — Un raisonnement analogue à celui qui précède (ci-dessus, a), conduirait à tenter l'épuisement du mélange d'antigènes par un excès d'anticorps, ce qui aboutirait à laisser persister, après centrifugation,

tous les antigènes sauf un ; ceci serait, sauf dans des cas très exceptionnels, sans utilité pratique, en raison de la dilution importante du mélange d'antigènes qu'un tel épuisement entraînerait.

Il resterait le moyen qui consisterait à diluer l'immunsérum polyvalent dans l'immunsérum monovalent et à préparer une série de tubes où l'on ferait entrer dans le milieu gélifié le premier sérum à concentration décroissante et le deuxième sérum à concentration croissante d'un tube à l'autre. A condition que le changement de concentration de l'immunsérum polyvalent soit assez faible, d'un tube à l'autre, pour qu'on puisse reconnaître les différentes zones dans deux tubes voisins, on pourrait ainsi, de proche en proche, identifier la zone du système simple (immunsérum monovalent pur) avec l'une des zones du système multiple (immunsérum polyvalent pur) placé à l'autre extrémité de la série.

§ 4. — *Réaction croisée de l'immunsérum du système multiple avec un antigène isolé.* — Les techniques qui ont été décrites au § 2 auraient des résultats différents si l'antigène (soit G') présent dans une préparation où il est seul capable de réagir avec l'immunsérum du système multiple, ne précipitait qu'une partie des anticorps précipitables par l'antigène correspondant G du mélange d'antigènes étudié. Cette éventualité serait réalisée si, par exemple, la réaction de G avec l'immunsérum était une réaction homologue ou directe et la réaction de G' avec le même sérum, une réaction hétérologue ou croisée.

Il résulte de l'étude des systèmes complexes que :

1° L'épuisement de l'immunsérum par la fraction qui contient G' n'entraînerait pas la disparition de la zone attribuable à G, mais seulement son atténuation (c'est-à-dire la diminution de son maximum de densité), dans une certaine mesure, qui serait fonction de la quantité des anticorps éliminés ; l'épuisement entraînerait, corrélativement, une accélération de la même zone, c'est-à-dire l'augmentation de l'espace franchi par elle en un temps donné.

2° Si l'on faisait entrer, à une concentration suffisante, l'antigène G' dans le mélange d'antigènes étudié, une nouvelle zone apparaîtrait, plus éloignée de l'interface que la zone attribuable à G, tandis que celle-ci aurait son maximum de densité diminué, comme ci-dessus (1°), et sa distance à l'interface en un temps donné augmentée par rapport au témoin, mais à un degré moindre (10) que ci-dessus (1°).

§ 5. — *Cas d'une même solution de plusieurs antigènes capables de précipiter avec les anticorps du système multiple étudié.* — Si

(10) Sous réserve de l'influence non spécifique de la concentration des substances autres que G', que peut contenir la préparation.

plusieurs antigènes au lieu d'un, réunis au sein d'un même liquide ont une spécificité plus ou moins semblable à celle de plusieurs antigènes du système, le problème de l'identification des zones est naturellement plus compliqué, et ses solutions moins précises que dans les cas précédents.

Les techniques proposées ci-dessus pour l'identification de la zone d'un antigène restent indiquées, mais il sera, dans bien des cas, prudent, sinon nécessaire, de se borner à préciser le nombre minimum des antigènes dont la spécificité est totalement ou partiellement la même dans les deux solutions que l'on compare.

*
* *

Nous avons dit, en commençant, les raisons, pour le biologiste, de préférer, dans le dénombrement des substances à grosses molécules, d'origine vivante, qui peuvent coexister en solution, le critère immunochimique aux critères des méthodes physico-chimiques, toutes les fois que le caractère antigénique de ces substances le permet, et les raisons de préférer, dans les mêmes circonstances, les réactifs immunochimiques à tous les autres à cause de leur douceur, lorsqu'on veut arriver à une représentation aussi exacte que possible de l'état naturel du matériel qu'on étudie.

Aux méthodes classiques de dosage — méthode de primo-floculation de Ramon, méthode des proportions optimales de Dean et Webb, méthode quantitative de Heidelberger — bien que susceptibles, en principe, d'être appliquées à l'analyse immunochimique telle que nous l'avons définie, devaient s'ajouter d'autres méthodes plus spécialement prévues pour servir à ses fins ; les premiers résultats acquis par la présente méthode [15] paraissent bien confirmer qu'elle doit arriver par des voies plus rapides à des dénombrements plus complets ; elle ne saurait pourtant se passer tout à fait de la méthode de Heidelberger, qui reste le seul moyen de comparer quantitativement deux systèmes précipitants simples différents ; c'est d'ailleurs celle-ci qui a permis aux immunochimistes de se faire une idée plus exacte des phénomènes de précipitation spécifique en les soumettant à une analyse rigoureuse. A ce titre, le présent travail en est, en quelque sorte, une conséquence.

Nous avons essayé, au cours de cet exposé, de classer les différents types de systèmes précipitants que l'on peut rencontrer dans l'analyse immunochimique, quelle que soit la méthode choisie.

Nous avons voulu, pour finir, montrer par quelques exemples, comment, des lois de l'immunochimie et de celles qui sont particulières à la présente méthode, pouvaient être tirés, à l'aide de

techniques appropriées, des renseignements plus précis, quoique non chiffrables, que le dénombrement des antigènes prévu par nous comme le premier but de l'analyse immuno-chimique.

L'identification, telle qu'elle est possible par l'analyse immuno-chimique, des antigènes éventuellement contenus dans deux liquides différents, exige la réaction de ces deux liquides avec le même immunosérum et ne peut se faire, comme dans les méthodes physico-chimiques, par la comparaison de deux résultats numériques obtenus séparément, même en des lieux et dans des temps très éloignés. En contre-partie, les conséquences que l'on peut tirer de la similitude totale ou partielle de spécificité antigénique de deux substances sont plus certaines et plus précises quant à la communauté d'origine et, sans doute, de fonction, de ces substances, que les conséquences que l'on peut actuellement tirer de leur ressemblance à tout autre point de vue.

Les cas particuliers que nous avons sommairement décrits laissent place à beaucoup d'autres éventualités et à d'autres voies vers une meilleure connaissance du liquide biologique soumis à l'étude ; car si nous avons pensé qu'il était utile de poser le problème de l'analyse immuno-chimique, la méthode que nous proposons dans le présent travail, pour le résoudre, n'a pas encore atteint son plein développement et ne saurait prétendre rester la seule, ni même la meilleure.

Résumé et conclusions.

1° L'*analyse immuno-chimique* qualitative doit permettre, avec les anticorps pour seuls réactifs, de dénombrer les antigènes contenus dans un mélange naturel et de reconnaître si leur spécificité est totalement ou partiellement la même que celle des antigènes contenus dans d'autres solutions (1^{re} partie, p. 32).

2° Le principe de la présente méthode consiste à laisser diffuser, dans un tube, l'antigène dans une solution contenant les anticorps, l'action de la pesanteur étant exclue. Quand la précipitation aura lieu dans la couche d'anticorps, on observera une zone de précipitation s'éloignant de l'interface au cours du temps : de la limite inférieure de cette zone à l'interface, la *densité de précipité* passera par un maximum et décroîtra du fait de l'inhibition de la précipitation par l'antigène en excès ; le raisonnement montre que la densité de précipité ne passera pas par plus de maximums qu'il n'y a d'antigènes intéressés dans la réaction [phénomène du type Liesegang mis à part] (1^{re} partie, p. 32).

3° La réalisation est obtenue d'une manière satisfaisante en incorporant de l'agar-agar à l'immunosérum. Les techniques sont décrites. On se sert ici d'immunosérums de Lapin (1^{re} partie, p. 36).

4° Une concentration minimale d'antigène est nécessaire à l'apparition de la zone de précipitation dans le gel. La distance de cette zone à l'interface augmente avec le temps ; dans un temps constant, la distance franchie varie dans le même sens que la concentration de l'antigène et en sens inverse de celle des anticorps (1^{re} partie, p. 40).

5° L'influence des principales variables sur l'aspect de la zone de précipitation est étudiée, avec l'ovalbumine cristallisée de Poule comme antigène. Le maximum de densité de précipité ne varie que peu ou pas avec le temps, ni avec la concentration initiale de l'antigène : il varie dans le même sens que la concentration des anticorps (1^{re} partie, p. 41 et fig. 3, 4 et 5).

6° L'étude de ces variables donne une idée des conditions nécessaires à l'apparition et à la perceptibilité d'une zone dans le gel ; la concentration minimale décelable d'ovalbumine est de l'ordre de 0.01 mg. par centimètre cube ; elle serait différente et peut-être plus élevée pour d'autres antigènes (1^{re} partie, p. 44).

7° On étudie et l'on discute les causes d'erreurs, a) rencontrées : précipitation non spécifique, stries plus denses ou moins denses et immobiles, par élévation ou abaissement de température (planche I, fig. 4, 5 et 6) ; b) non rencontrées : phénomène du type Liesegang, qui donnerait lieu à des stries périodiques immobiles (1^{re} partie, p. 45).

8° On donne six autres exemples de *systèmes précipitants simples* (un seul antigène réagit), soit : l'ovalbumine de Cane (réaction hétérologue), deux antigènes différents présents dans l'albumine du sérum de Cheval, deux polysides bactériens — *E. typhosa* O-901 (1^{re} partie, fig. 6) et *Pneumococcus* t. VIII —, l'antigène somatique O de *E. typhosa*. Dans chacun des sept cas, on n'observe qu'un maximum de densité de précipité (1^{re} partie, p. 47).

9° Avec les quatre albumines animales, on observe une zone limitée en bas par une frontière très précise ; avec les trois antigènes bactériens la limite inférieure est imprécise en raison, probablement, de la polydispersion de ces trois antigènes (1^{re} partie, p. 49).

10° On définit les *systèmes précipitants complexes* et les divers types qui peuvent en être rencontrés. On étudie deux exemples de systèmes complexes à deux antigènes réagissant avec les anticorps homologues d'un seul d'entre eux : a) deux ovalbumines [Poule et Cane] (planche I, fig. 7 et 8), b) antigène somatique O et polyside O de *E. typhosa* (planche I, fig. 9). La zone de l'antigène homologue est toujours la plus rapprochée de l'interface. Le premier exemple montre qu'une condition supplémentaire à l'apparition d'une zone distincte pour l'antigène hétérologue est que sa concentration initiale atteigne une valeur minimale, fonc-

tion de celle de l'antigène homologue. La distance de la frontière de la zone de chaque antigène à l'interface est, pour une part, fonction de la concentration initiale de l'autre antigène (p. 110).

11° On donne le nom de *systèmes multiples* à ceux où plusieurs systèmes simples ou complexes réagissent simultanément dans le même tube. L'expérience, portant sur quatre des antigènes ci dessus, appartenant à deux systèmes simples et à un système complexe (planche I, fig. 10) montre que l'influence mutuelle des divers systèmes ainsi réunis est nulle ou négligeable. L'image donnée par la réaction de plusieurs antigènes étrangers les uns aux autres avec leurs anticorps est la superposition des images que chacun donnerait s'il réagissait seul (p. 116).

12° L'objet de la présente méthode est l'étude des systèmes multiples naturels dans lesquels le nombre des antigènes est inconnu et tout ou partie d'entre eux non isolés chimiquement. On déduit de ce qui précède quelques modalités d'application de la présente méthode à des cas de cette nature (p. 119).

13° L'origine biologique des deux mélanges de réactifs ne permet des résultats exactement reproductibles qu'avec les mêmes échantillons ; l'évolution de la réaction dans le temps ne modifie pas sensiblement les proportions de chaque image ; au contraire, les variations individuelles de concentration des antigènes et surtout des anticorps rendront souvent douteuse ou impossible l'identification des zones correspondantes d'une image à l'autre (p. 120).

14° On indique les moyens d'identifier la zone d'un antigène isolé avec la zone du même antigène appartenant à un mélange : l'épuisement des anticorps entraîne la disparition de la zone ; l'enrichissement du mélange d'antigènes entraîne l'accélération de la même zone, par rapport au témoin (p. 122 et planche I, fig. 11).

15° On déduit de ce qui précède quelques possibilités d'application de la présente méthode à d'autres cas plus compliqués (p. 123).

BIBLIOGRAPHIE

Les références bibliographiques de 1 à 37, ont été données à la suite de la première partie du présent mémoire [38].

[38] OUDIN (J.). Ces *Annales*, 1948, **75**, 30-51.

[39] LANDSTEINER (K.) et VAN DER SCHEER (J.). *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 445-454.

[40] CONDREA (P.) et POENARU (H.). *Arch. Roum. Path. exp. et Microbiol.*, 1943, **13**, 187-195.

PLANCHE I

Toutes les figures, sauf la figure 6, sont à la même échelle que les figures 7 et 8. (Gross. : $\times 1,5$.)

FIG. 1. — Évolution de l'image de la zone de précipitation (ovalbumine de Poule-immunsérum homologue de Lapin) au cours du temps t . Les tracés microphotométriques ont été reproduits figure 3 dans la première partie du mémoire. Chaque trait blanc indique le niveau de l'interface.

FIG. 2. — Mêmes réactifs que figure 1. Modifications de l'image en fonction de la concentration des anticorps, dans des temps calculés pour que la distance de la frontière à l'interface soit sensiblement la même dans les trois cuves au moment de la photographie (voir les tracés microphotométriques, figure 4 de la première partie du mémoire). Les chiffres qui figurent au-dessous de chaque image sont proportionnels à la concentration des anticorps.

FIG. 3. — Mêmes réactifs que figures 1 et 2. Modifications de l'image en fonction de la concentration initiale de l'antigène, dans des temps calculés pour que la distance de la frontière à l'interface soit sensiblement la même dans les trois cuves au moment de la photographie. Les tracés microphotométriques correspondants ont été reproduits (fig. 5) dans la première partie du mémoire; par suite d'une erreur, l'image A correspond au tracé C, et réciproquement. Les chiffres qui figurent au-dessous de chaque image sont proportionnels aux concentrations initiales de l'antigène.

FIG. 4 et 5. — Mêmes réactifs que figures 1 à 3. Effets des changements de température. Images de deux cuves de contenu identique évoluant depuis le même temps à $22^{\circ}5$. Au même moment, l'une des cuves a été portée à 37° : apparition d'une strie plus dense que la zone (A); l'autre a été portée à environ 4° : apparition d'une strie moins dense que la zone (B). La photographie de la figure 4 a été prise immédiatement avant le retour des 2 cuves à $22^{\circ}5$; on voit sur la figure 5 l'effet de ce deuxième changement de température en sens inverse du premier (abaissement pour A : strie moins dense; élévation pour B : strie plus dense), chaque strie reste fixée au niveau où était la frontière lors du changement de température; l'intervalle qui sépare les deux stries est plus grand en A qu'en B parce qu'il correspond à l'espace franchi par la frontière dans le même temps à une température plus élevée en A (37°) qu'en B (4°).

FIG. 6. — Mêmes réactifs que dans les figures précédentes. Effet de changements passagers de température. (Gross. $\times 4$.) Deux cuves de contenu identique évoluant à $22^{\circ}5$, ont été soumises simultanément à des changements passagers de température : A, abaissement passager de température (séjour d'environ 15 minutes à environ 4° et retour à $22^{\circ}5$) ; apparition de deux stries contigües; la première (la plus élevée) moins dense, la deuxième plus dense que la zone; B, élévation passagère de température (séjour d'environ 15 minutes à 37°) ; les deux stries contigües sont en ordre inverse de A.

FIG 7 et 8. — Etude du système précipitant complexe formé par la réaction des ovalbumines de Poule (OP) et de Cane (OC) avec un sérum anti-ovalbumine de Poule à une concentration constante dans le gel. g_P est la concentration (en mg d'azote par cm^3) d'OP; g_C est la concentration d'OC, dans chaque tube. Figure 7 : g_P constante (2,5); g_C décroissante; 8 tubes, à comparer deux par deux (mélange OP-OC et OC seule). Figure 8 : g_C constante (2,5); g_P décroissante; 9 tubes, à comparer trois par trois : réaction du mélange avec le sérum non modifié et avec le sérum épuisé par OC (tubes marqués E), réaction d'OP seule avec le sérum non modifié. Photographies prises au bout de 7 jours. Une échelle millimétrique a été photographiée au même grossissement que les tubes.

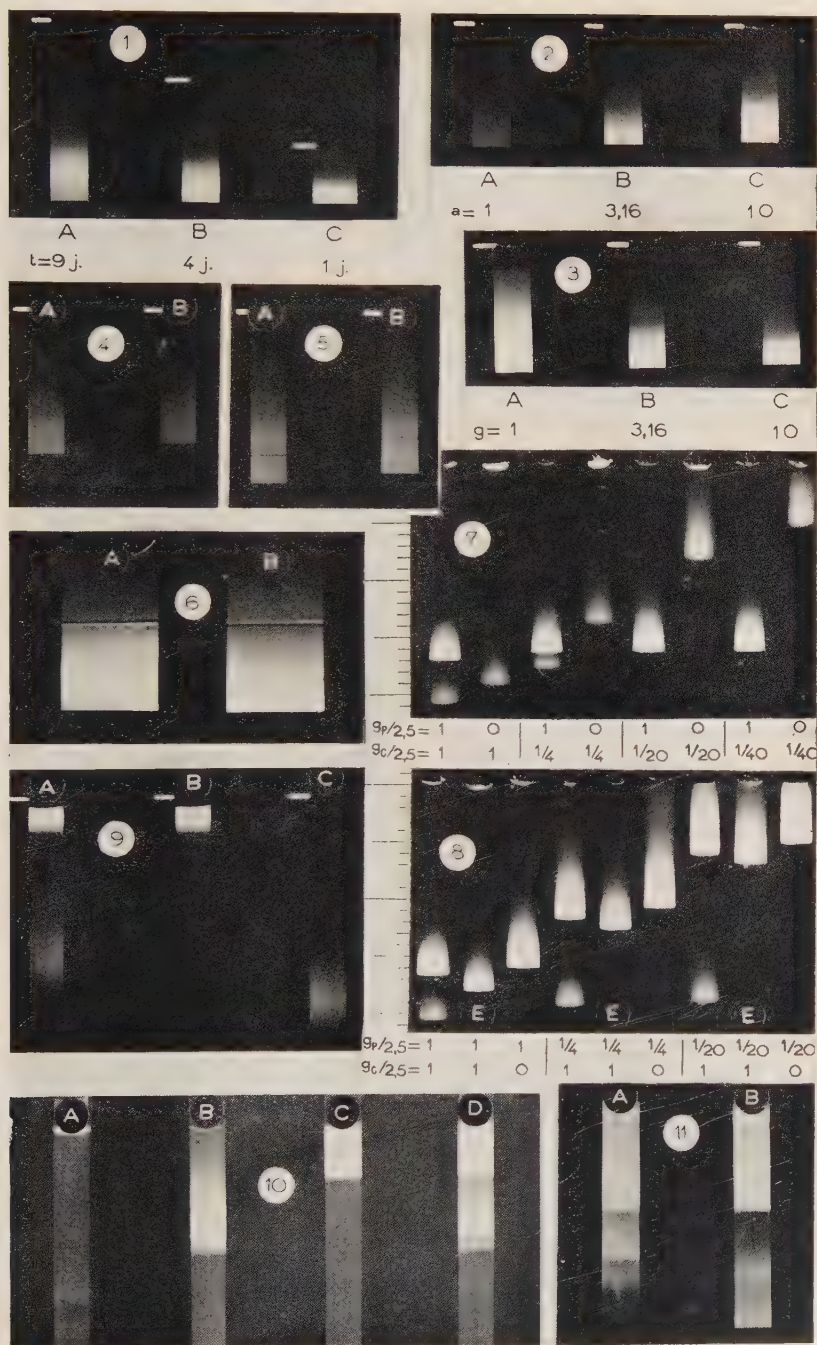


FIG. 9. — A : système précipitant complexe formé par la réaction d'un mélange de l'antigène somatique O de *E. typhosa* et du polyoside O du même bacille avec le sérum anti-antigène somatique; B: réaction de l'immunsérum épuisé par le polyoside, avec l'antigène somatique; C: réaction de l'immunsérum avec le polyoside seul (concentration initiale : 1 mg par cm^3). Photographie prise au bout de 12 jours.

FIG. 10. — Étude d'un système précipitant multiple (D) décomposable en deux systèmes simples (A et C) et un système complexe (B). Le milieu gélifié contient, dans les quatre cuves, le même mélange des trois immunsérums : 1° anti-antigène somatique O de *E. typhosa*, 2° anti-ovalbumine de Poule, 3° anti-sérum de Cheval; A, réaction de ce mélange avec le polyoside O de *E. typhosa* (Concentration initiale: 9 mg. par cm^3), la densité maximum de la zone est très faible; B, réaction du même mélange d'immunsérums avec un mélange d'ovalbumines de Poule et de Cane (0,45 et 0,15 mg. d'azote par cm^3); C, réaction du même mélange d'immunsérums avec une fraction purifiée (T5) d'albumine du sérum de Cheval (1 mg. par cm^3); D, réaction du même mélange d'immunsérums avec le mélange des quatre antigènes ci-dessus; dans ce mélange la concentration de chaque antigène est la même qu'en A, B ou C. Photographie prise au bout de 4 jours.

FIG. 11. — Exemple de l'identification de la zone spécifique d'un antigène qu'on possède à l'état isolé, dans un système précipitant multiple. La composition du milieu gélifié est la même en A et en B; elle est qualitativement la même que figure 10; celle du mélange d'antigènes est qualitativement la même (sans ovalbumine de Cane) que figure 10; en B, on a enrichi, par rapport à A, le mélange d'antigènes en ovalbumine de Poule, dont on a fait passer la concentration de 0,3 à 3,6 mg d'azote par cm^3 ; l'aspect et le niveau des zones des deux autres antigènes ne sont pas sensiblement modifiés; seule, la distance de la zone de l'ovalbumine à l'interface est augmentée; la zone de l'ovalbumine a dépassé la zone du polyoside. Photographie prise au bout de 5 jours.

ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE DE LA GONADOTROPHINE CHORIALE HUMAINE

II. — COEXISTENCE D'ANTICORPS PRÉCIPITANTS ET NON PRÉCIPITANTS DANS L'ANTISÉRUM DE LAPIN

par ALAIN BUSSARD (*).

Nous avons rapporté, dans le mémoire précédent, la possibilité de précipiter spécifiquement l'hormone choriale humaine par l'antisérum de lapin homologue, immunisé dans certaines conditions.

Nous avons pu mettre en évidence la présence de l'hormone dans le précipité, après sa libération par l'alcool éthylique. L'antigène employé possédant l'avantage d'être repérable et dosable par son activité physiologique, nous avons alors cherché à préciser quantitativement les phénomènes de précipitation spécifique.

Résultats expérimentaux.

I. — HORMONE PRÉSENTE DANS LE PRÉCIPITÉ.

Précisons que, dans toutes les expériences décrites, nous avons utilisé, pour la précipitation, les proportions suivantes : 1 cm³ de sérum XII et 50 unités de C_s (1). Ces proportions correspondent à un excès d'anticorps au point de vue neutralisation physiologique de l'hormone. On a étudié deux types de précipité : A, obtenu après vingt-quatre heures de contact à + 5°, B, résultant de la précipitation ultérieure du surnageant de A, pendant un séjour supplémentaire de cinq jours à + 5°. Nous avons, en effet, constaté que, lorsqu'on isole le précipité formé

(*) Communication présentée le 3 juin 1948 à la Société française de Microbiologie. Travail effectué dans les service de Chimie microbienne de l'I. P. avec la collaboration technique de M^{lle} Courcon.

(1) Pour les détails de la technique, voir le premier mémoire.

pendant vingt-quatre heures à 5°, dans le système : gonadotrophine choriale-antisérum de lapin, le surnageant, d'abord limpide, précipite à nouveau. Cette précipitation est quantitativement importante, nous avons vérifié qu'elle n'était pas due à une contamination bactérienne. C'est ce précipité B et son liquide surnageant que nous avons également étudiés.

Le traitement par l'alcool met en œuvre l'alcool éthylique à 80 p. 100 pour les sérums, ou 96 p. 100 pour les précipités. Il se poursuit pendant vingt-quatre heures à 37°.

TABLEAU 1. — Présence de l'hormone dans le précipité.

NUMÉRO de expérience	PRODUIT INJECTÉ		NOMBRE d'animaux utilisés	RÉACTION PHYSIOLOGIQUE		
	Nature	Quantité en γ d'azote		Poids de l'utérus en mg. pour 100 g. d'animal $\pm \sigma$	Poids des ovaires en mg. pour 100 g. d'animal $\pm \sigma$	Ouverture du vagin
.....	Témoins non injectés. .	0	20	50,5 \pm 6	46,4 \pm 6,2	0
.....	Précipité A (24 heures de contact) non traité . .	70	5	109 \pm 23	66 \pm 17	0
.....	Précipité A traité par l'alcool (1)	130	5	220 \pm 28	68 \pm 10	5
.....	Id.	20	5	230 \pm 6,4	61 \pm 3,5	5
.....	Id.	10	5	57 \pm 2,5	49 \pm 2	0
.....	Précipité B (6 jours de contact) traité 24 heures par l'alcool.		5	113 \pm 42	45 \pm 9	1

) En 3 injections. Réaction observée à la 96^e heure. Les résultats représentent la moyenne \pm , l'écart moyen : σ .

L'examen du tableau I indique qu'une unité d'hormone est présente dans un poids compris entre 10 et 20 γ d'azote du précipité. Nous pouvons admettre, par un calcul grossièrement approché, que l'unité représente environ 15 γ d'N de précipité. C'est donc environ 5 unités que nous avons dans un précipité contenant 75 γ d'N. Après cinq nouveaux jours de précipitation, le précipité contient au moins 1 unité d'hormone ; bien que le dosage d'N n'ait pas été fait, l'aspect macroscopique semble indiquer une précipitation aussi importante que la précédente. Au total, le dosage très approché nous indique que 6 unités hormonales ont donc été récupérées dans la précipitation, ce qui représente 12 p. 100 de l'activité initiale mise en jeu ; que sont devenus les 88 p. 100 restants ? On peut évidemment penser que le traitement alcoolique n'a pas libéré la totalité de l'hormone présente dans le précipité ; il est en effet très vraisemblable que la restitution de l'activité n'est pas de 100 p. 100. Nous avons cependant recherché

si le surnageant de la précipitation ne contenait pas une certaine quantité d'hormone.

II. — HORMONE PRÉSENTE DANS UN COMPLEXE SOLUBLE.

Si l'on traite le surnageant de la précipitation par de l'alcool éthylique, la concentration atteignant 80 p. 100, tous les protéides du sérum précipitent. Nous avons laissé ce mélange à 37° pendant vingt-quatre heures. Après quoi on centrifuge et le précipité est remis en suspension dans une solution physiologique. C'est cette suspension qui est injectée, après homogénéisation, aux animaux.

D'après le tableau II (2 et 3) nous constatons d'abord que 1,5 cm³ du surnageant injecté tel quel ne manifeste pas d'activité gonadotrope, ce qui vérifie bien que les proportions employées correspondent à un excès d'anticorps. L'action de l'alcool sur un sérum normal de lapin ne provoque pas, d'autre part, l'apparition d'une activité gonadotrope (tableau II, 1).

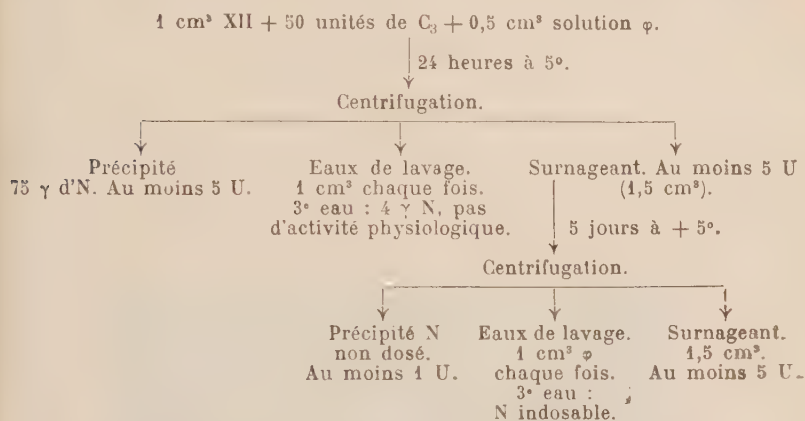
TABLEAU II. — Présence de l'hormone dans le surnageant.

NUMÉRO de l'expérience	PRODUIT INJECTÉ	NOMBRE d'animaux utilisés	RÉACTION PHYSIOLOGIQUE		
			Poids de l'utérus en mg. pour 100 g. d'animal $\pm \sigma$.	Poids des ovaires en mg. pour 100 g. d'animal $\pm \sigma$.	Ouvr. du vi
1.	Précipité alcoolique de 1 cm ³ de sérum normal	6	59 \pm 9,2	54,5 \pm 1,8	0
2.	1,5 cm ³ du surnageant A (24 heures de contact).	10	53 \pm 8	47 \pm 7	0
3.	1 cm ³ du surnageant B (6 jours de contact)	5	58 \pm 11	48,6 \pm 4	0
4.	Précipité alcoolique de 0,7 cm ³ du surnageant A.	5	202 \pm 110	68 \pm 10	5
5.	Précipité alcoolique de 1 cm ³ du surnageant B.	6	370 \pm 47	73 \pm 6	6

Par contre, le traitement par l'alcool des surnageants A et B libère une activité gonadotrope importante. Au point de vue quantitatif on peut admettre que 0,7 cm³ du surnageant A contenait au moins 2 unités, soit, pour 1,5 cm³ : 4 à 5 unités.

Quant au surnageant B, il contient au moins 3 unités pour 1 cm³, soit environ 5 unités pour 1,5 cm³. La différence d'action sur l'utérus et l'ovaire des surnageants A et B n'a probablement pas de signification, surtout si l'on songe qu'il existe une différence

entre les quantités injectées. Les photos 1 et 2 illustrent assez nettement la réaction de l'utérus et de l'ovaire. On peut résumer les phénomènes par le schéma suivant :



Nota. — L'activité signalée dans les précipités et surnageants est celle remise en liberté par action de l'alcool.

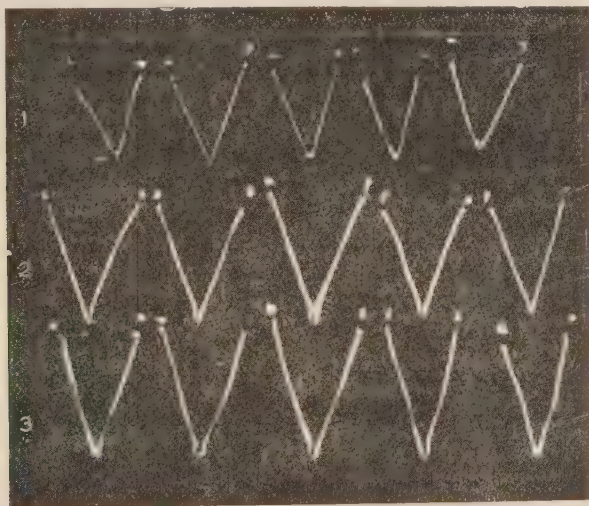


FIG. 1. — Utérus et ovaire de : 1° Témoins non injectés; 2° Sujets ayant reçu 130 γ d'N de précipité A; 3° Sujets ayant reçu 20 γ d'N de précipité A.

Autrement dit, 10 p. 100 de l'hormone sont récupérés dans le précipité de vingt-quatre heures et 2 p. 100 précipitent encore

au bout de cinq jours à $+ 5^{\circ}$. Quant au surnageant il contient également au moins 10 p. 100 de l'hormone mise en jeu au début de l'expérience, dans un complexe soluble inactif, dissociable au moins partiellement par l'alcool.

Discussion. — Conclusions.

Il est généralement admis en immunochimie que, dans la zone d'excès d'anticorps, pour le sérum de lapin, l'antigène est entièrement précipité. Nos résultats sont en contradiction avec cette opinion ; comment l'expliquer ?

La présence d'un complexe soluble dans la région d'excès

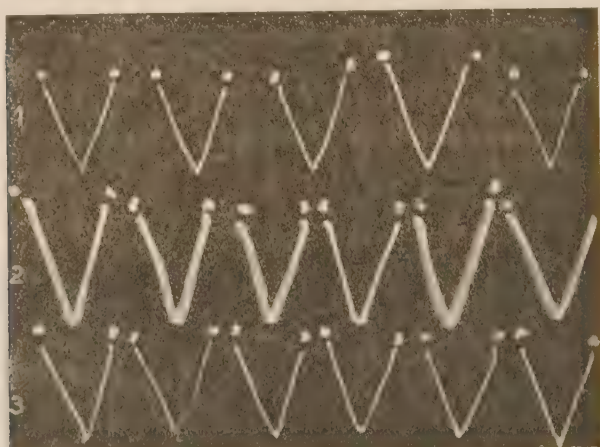


FIG. 2. — Utérus et ovaires de sujets ayant reçu : 1° Précipité alcoolique de 1 cm³ de sérum normal; 2° Précipité alcoolique de 1 cm³ du surnageant B; 3° 1 cm³ du surnageant B.

d'anticorps pourrait être due simplement à la solubilité propre du précipité. Nous ne pensons pas cependant que cette raison soit suffisante pour expliquer l'activité récupérée dans le surnageant. En effet, les solubilités des précipités protéides-anti-protéides sont faibles, de l'ordre de 3 à 5 γ d'N par centimètre cube (voir Oudin et Grabar [7], Marrack et Smith [5]) dans NaCl 0,85 p. 100. Si on admet des solubilités analogues pour le précipité hormone-antihormone (les résultats de nos dosages de l'azote des eaux de lavage correspondent à des solubilités de cet ordre), nos surnageants contiendraient environ 25 γ de protéides par centimètre cube. Ces taux ne suffisent pas à expliquer l'activité hormonale récupérée par l'action de l'alcool. Cependant, pour

écarter l'hypothèse d'une simple solubilité du précipité, le traitement par l'alcool des eaux de lavage doit être pratiqué. Nous nous y appliquons actuellement.

Avec les sérums de lapins antigonadotropes, nous avons jusqu'ici toujours constaté que la neutralisation s'effectue pour un rapport $\frac{\text{antigène}}{\text{anticorps}}$ inférieur à celui existant à la zone d'équiva-

lence de la précipitation. On peut comparer notre système précipitant avec le système toxine-antitoxine où il est possible de mesurer également la neutralisation de la toxine et sa précipitation par l'antisérum. Dans ce cas, les proportions des constituants pour la neutralisation et pour la floculation sont souvent peu éloignées l'une de l'autre (Landsteiner [4]). Dans nos expériences, l'hormone ne représente qu'une petite partie de l'antigène précipitant (pour C₃ par exemple, si on admet que le produit de Shedlovsky à 12.000 U/mg. correspond à l'hormone pure, notre préparation ne contiendrait que 0,83 p. 100 d'hormone et le produit M en contiendrait 50 p. 100). Comme nos précipitations ont été effectuées avec des sérums non épuisés, pour obtenir des quantités de produit précipité plus faciles à manipuler, on peut facilement admettre que, après neutralisation de l'hormone par les anticorps spécifiques, d'autres anticorps précipitent des antigènes non hormonaux contenus dans la préparation.

Une autre question se pose : comment expliquer la précipitation retardée d'une nouvelle quantité d'hormone au bout de vingt-quatre heures? On peut imaginer qu'il s'agit là d'un complexe hormone-anticorps spécifique (association bloquant l'activité de l'hormone puisque le surnageant, non traité, est inactif) qui précipite lentement, peut-être par remaniement du complexe avec changement des proportions antigène-anticorps. Ce phénomène peut être considéré comme une preuve de l'existence de complexes hormone-antihormone, au moins momentanément solubles dans la zone des proportions d'excès (physiologique) d'anticorps.

On peut ainsi décrire, avec quelque vraisemblance, les phénomènes obtenus : l'antisérum de lapin contient, entre autres, des anticorps spécifiques antihormone ; certains précipitent avec celle-ci immédiatement, d'autres — du type des « anticorps incomplets » d'Heidelberger [2] ou des « anticorps bloquants » de Wiener [10] — s'associent également spécifiquement à l'hormone en bloquant ses groupes actifs, mais sans entraîner de précipitation. La distinction entre ces deux types d'anticorps n'est peut-être pas absolue puisqu'au moins une partie des complexes solubles peut, au bout d'un certain laps de temps, précipiter aussi.

Cette hypothèse nous paraît répondre à une importante question soulevée dans l'étude des antihormones. Alors que les sérums antihormonaux sont toujours protecteurs, et que toutes leurs pro-

priétés (spécificité, fraction active, mode de production, etc...) les rattachaient aux sérums immuns, il restait le fait que leur précipitabilité était rarement spécifique (2).

Les anticorps non précipitants généralement obtenus sont, à nos yeux, du type bloquant, ils s'associent à l'hormone pour neutraliser son activité, puisque, en fin de compte, il faut bien imaginer un mécanisme matériel quelconque par lequel l'antihormone bloque l'hormone.

Les auteurs qui, tels Zondek et Sulman [41], tiennent à conserver une distinction entre anticorps et antihormone ne peuvent que proposer une activité de caractère immatériel de l'antihormone. C'est un net retour en arrière si l'on songe que l'immunochimie s'est débarrassée des notions de « fonction » ou de « principe » anticorps pour préciser le caractère chimique de ceux-ci.

Quant à l'hypothèse de « ferments de défense » d'Abderhalden, émise par Sulman [8], on peut faire remarquer qu'on en est encore à attendre la preuve expérimentale décisive de leur existence ; il paraît donc un peu prématuré de les mettre en cause dans le phénomène antihormonal. Une telle hypothèse nécessiterait d'ailleurs les preuves expérimentales :

1° De l'apparition très rapide, dans l'urine, comme dans le sérum, de ferments, après l'injection de l'hormone.

2° Du caractère protéolytique de ces ferments.

En réalité, la distinction proposée par certains auteurs est due au fait que ceux-ci associent implicitement la notion de *précipitation* à celle d'*anticorps*. A ceci on peut répondre deux choses :

a) La précipitabilité peut exiger certaines conditions, assez strictes pour que dans la pratique courante elles ne soient pas réalisées. C'est ainsi que, jusqu'à Nicolle, Cesari et Jouan, la flocculation des toxines est passée inaperçue. Jusqu'à cette époque on aurait donc pu soutenir que les antitoxines n'étaient pas des anticorps.

b) On sait actuellement que certains anticorps ne sont pas précipitants, tels les anticorps appelés : bloquants, incomplets, mono-valents.

Les sérums obtenus par nous contiennent donc : a) des anticorps non précipitants (ou plutôt peu précipitants et protecteurs), du type ordinaire des antihormones ; ce sont probablement eux qui apparaissent les premiers au cours de l'immunisation, ce sont les seuls dont ont disposé la plupart des auteurs travaillant sur les antihormones ; b) les anticorps précipitants et protecteurs.

(2) Remarquons que les immunisations ont, en général, été réalisées avec des techniques plus endocrinologiques (voie d'injection sous-cutanée, doses rapprochées, durée totale courte, absence « d'adjuvants » qu'immunologiques.

Comment expliquer la formation de ces différents types d'anticorps ? La voie à injection joue peut-être un rôle important, puisqu'on a vu que, dans le cas du cheval (H. Treffers et al [9]) elle avait un rôle primordial (3) ; le rôle des adjuvants (adsorbant dans notre cas) doit être également important si l'on songe aux résultats imprévus et intéressants obtenus récemment par Kabat [3] et par Morgan [6] par exemple, avec la technique de Freund.

Quant au mode d'inactivation de l'hormone par les anticorps, on est ici, comme dans le cas des toxines, encore dans le domaine des suppositions ; l'anticorps ne joue peut-être qu'un rôle physique empêchant l'hormone de pénétrer dans les cellules des organes sensibles, ou bien il crée un obstacle stérique autour des groupes actifs de l'hormone ; quoi qu'il en soit, nous avons apporté la preuve qu'il ne s'agit pas d'un changement totalement irréversible puisqu'un traitement approprié permet de retrouver, dans le complexe, une activité hormonale.

Je remercie M. P. Grabar, dans le service duquel ces recherches ont été poursuivies, de l'aide bienveillante qu'il m'a apportée. Je remercie également M^{lle} G. Christol, collaboratrice technique du C. N. R. S. et M. M. Challeil de l'aide apportée dans l'expérimentation animale.

Résumé.

1° Les sérums de lapins, immunisés par des injections intra-veineuses d'hormone choriale humaine, précipitent et neutralisent spécifiquement cette gonadotrophine. On peut, dans le précipité, physiologiquement inactif pour la rate impubère, recouvrer une activité hormonale par un traitement à l'alcool.

2° L'étude du surnageant de la précipitation, effectuée dans une zone d'excès d'anticorps (au point de vue neutralisation physiologique), indique qu'il contient une certaine quantité d'hormone décelable après traitement alcoolique.

3° Le complexe soluble hormone-anticorps peut, au bout d'un certain temps, précipiter, au moins partiellement. Les expériences rapportées, ainsi que celles obtenues par quelques autres auteurs, nous permettent d'identifier complètement antihormones et anticorps et peut-être d'expliquer certains résultats aberrants obtenus dans ce domaine. Il n'y a donc pas de raisons de faire encore aux antihormones une place à part dans l'étude des phénomènes de l'immunité.

(3) GRABAR [4] a récemment proposé une hypothèse de spécificité topographique et organique de fabrication des anticorps.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRABAR (P.). *Les globulines du sérum sanguin*, Masson, Paris, 1947.
- [2] HEIDELBERGER (M.). *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 697.
- [3] KABAT (E.). *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 117.
- [4] LANDSTEINER (K.). *The specificity of serological reactions*, Harvard U. Press, 1946, 241.
- [5] MARRACK (J.) et SMITH (F. C.). *Brit. J. exp. Path.*, 1931, **12**, 30.
- [6] MORGAN (M.). *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 131.
- [7] OUDIN (J.) et GRABAR (P.). *Ces Annales*, 1944, **70**, 7.
- [8] SULMAN (F.). *J. exp. Med.*, 1937, **65**, 1.
- [9] TREFFERS (H. P.), HEIDELBERGER (M.) et FREUND (I.). *J. exp. Med.*, 1947, **86**, 89.
- [10] WIENER (A. S.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1944, **56**, 173.
- [11] ZONDEK (B.) et SULMAN (F.). *The antigenadotropic factor*. Williams and Wilkins, 1942, Baltimore.

FATIGUE MUSCULAIRE, pH ET PROLIFÉRATION BACTÉRIENNE DANS LA VIANDE

par M. INGRAM (*).

*(Low Temperature Station for Research in Biochemistry
and Biophysics, University of Cambridge and Department
of Scientific and Industrial Research.)*

C'est un fait bien établi que les animaux fatigués avant d'être menés à l'abattoir donnent une viande altérée se conservant mal.

Ce travail donne un bref compte rendu de quelques-unes des raisons responsables de ce fait.

En 1934, après la réorganisation de l'industrie du « bacon » dans l'Irlande septentrionale, il y eut beaucoup de jambons avariés. La caractéristique essentielle de la réorganisation était la suivante : la coutume avait été de tuer les porcs à la ferme même, et de les transporter aux abattoirs de l'usine tandis que, sous le nouveau régime, les animaux étaient envoyés vivants à l'usine pour y être tués.

La comparaison entre la viande des porcs tués à la ferme et celle des porcs tués à l'usine révèle que la plus forte corruption de cette dernière était en rapport avec une augmentation de la résistance électrique de la chair (tableau I).

TABLEAU I.

LIEU de l'abatage	NOMBRE d'animaux	RÉSISTANCE ÉLECTRIQUE (ohms)			NOMBRE DE JAMBONS putréfiés	
		min.	max.	moyenne	légèrement	fortement
Ferme. .	20	204	240	233	0	0
Usine . .	40	220	800	469	14	14

On constata ensuite qu'une résistance électrique élevée s'accompagne d'un pH relativement élevé (Callow, 1936 c), et qu'un pH élevé de même qu'une résistance électrique élevée marchent

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 13 mai 1948.

de pair avec une forte proportion d'altération de la viande (tableau II).

TABLEAU II.

NOMBRE de jambons	DEGRÉ D'AVARIE	pH	
		Moyenne \pm	Erreur standard
146.	Pas.	5,65 \pm	0,017
47.	Faible.	5,74 \pm	0,038
48.	Grave.	5,84 \pm	0,045

On reconnut bientôt que l'augmentation du pH et de la résistance électrique est due à la fatigue des bêtes au moment de l'abatage. Les principaux faits qui étayent cette hypothèse sont :

I. — La chair des pores, fatigués à dessein par le trajet juste avant d'être abattus, a une forte résistance électrique (Callow, 1935).

II. — Lorsque les bêtes sont mises au repos à leur arrivée à l'usine, leur chair a la qualité de celle des bêtes tuées à la ferme (tableau III).

TABLEAU III.

TEMPS de repos (heures)	RÉSISTANCE électrique moyenne (ohms)	pH	POURCENTAGE de jambons putréfiés	
			Fortement putréfiés	Légèrement putréfiés
22	445	5,91	5	40
46	355	5,78	2 1/2	12 1/2
70	295	5,59	0	5

III. — Les conséquences de la fatigue, en augmentant la résistance électrique et le pH, peuvent être abolies dans un temps plus court en alimentant les animaux mis au repos (tableau IV in Callow, Ingram et Hawthorne, 1939).

Depuis lors, ces mesures sont employées au Danemark où il a été confirmé que de donner du sucre aux pores fatigués redonne à leur chair les caractères d'acidité de la chair des animaux non fatigués et retarde beaucoup l'altération du bacon (Madsen, 1943).

Les conséquences de la fatigue, du repos et de l'alimentation peuvent se traduire sous forme de modifications physiologiques du muscle après la mort. Ici on ne peut qu'esquisser le problème :

TABLEAU IV.

	A		B	
	Non reposés	Reposés	Non reposés	Reposés et nourris
Nombre de porcs.	52	52	32	32
Poids moyen du foie (g.)	1.725	1.526	1.623	1.622
Moyenne des pH du grand psoas.	5,79	5,80	5,87	5,58
Moyenne des pH du long dorsal.	5,39	5,45	5,58	5,47

consulter Bate-Smith (1947) pour renseignements récents et détaillés.

I. — Le pH du muscle représente un équilibre entre le pouvoir tamponnant d'un groupe de substances (amines, phosphates, etc.) qui, seules, donnent un pH voisin de la neutralité (environ 7,0), et des substances acides dont l'acide lactique est de loin le plus important (Bate-Smith, 1936).

II. — La quantité d'acide lactique est très variable. Au cours de la vie, l'acide lactique, engendré par le glycogène du muscle après l'effort, est éliminé par le sang. Après la mort, la réserve de glycogène se scinde peu à peu pour former de l'acide lactique pendant que se produit la rigidité cadavérique ; mais, du fait de l'arrêt de la circulation sanguine, l'acide lactique s'accumule dans le muscle. Si un muscle est fatigué peu avant la mort, sa réserve glycogénique est épuisée et ne peut se reconstituer : c'est pourquoi il reste moins de glycogène, l'acide lactique ne peut plus se former et la chair est moins acide (Bate-Smith, 1938).

III. — Dans un muscle ayant une réserve complète de glycogène, il peut se former une quantité suffisante d'acide lactique pour amener le pH jusqu'à 5,4-5,5 (chez le porc). Dans le muscle fatigué le pH sera supérieur à 5,5. Ce pH croît avec le degré de fatigue et approche de 7,0 si l'épuisement est total (Callow, 1937 a).

IV. — Si les bêtes ne sont pas nourries, la régénérescence du glycogène dans les muscles ne se fait que très lentement à partir du foie. Si les bêtes sont nourries, les muscles sont approvisionnés par le sang et le glycogène hépatique est inutile (tableau IV) ; le réapprovisionnement en glycogène serait particulièrement rapide si les bêtes ingèrent du sucre (Bate-Smith, 1937 a).

Ce processus est le même chez tous les mammifères domestiques, malgré de légères différences quantitatives d'une espèce à l'autre. Par exemple, le pH du tissu musculaire des bovins varie dans une zone plus étroite et il est plus acide, 5,1 à 6,2

(Callow, expériences inédites) : de ce fait, on constate que la chair de bœuf est moins périssable que celle de porc.

Le porc est particulièrement sensible aux effets de la fatigue. Son sucre sanguin est exceptionnellement faible (Bale-Smith, 1937 c), et la récupération du glycogène musculaire après une marche est lente. Ainsi, chez des porcs fatigués, il est très probable que la chair d'un grand nombre d'entre eux restera relativement alcaline après l'abatage.

La corruption de la chair, manifestation visible de cette fatigue, est due à une action bactérienne. Du point de vue bactériologique, on est amené à rechercher quelle est la signification des différences de pH dues à la fatigue. Peuvent-elles expliquer une augmentation de la proportion des viandes corrompues ? Il est prouvé que ces différences de pH dues à la fatigue sont du même ordre de grandeur que celle qui permet la pullulation des bactéries infectantes. La figure 1 montre le rôle de l'acidité sur la vitesse de développement de trois microbes isolés sur des jambons corrompus : il est clair que dans la gamme de pH en question, une légère diminution d'acidité se produit dans chaque cas avec gros accroissement dans la vitesse de développement des bactéries.

Depuis, on a constaté qu'un changement d'acidité contrôle le développement de bactéries putréfiantes non seulement dans les jambons d'Irlande, mais aussi dans les jambons d'autres régions ; en effet, le comportement de 46 espèces bactériennes différentes isolées à partir de jambons corrompus et de quartiers de bacon fut le même ; ces espèces furent : des clostridii, des bacilles, des staphylocoques, des streptocoques et enfin divers microcoques et bacilles Gram-négatifs.

À un pH de 5,5, 15 de ces microorganismes ne poussèrent pas et, quant aux autres espèces, la vitesse de développement était de 5,2 fois plus grande à pH 6,5 qu'à pH 5,5. D'autres auteurs ont fait des observations similaires : par exemple, Haines et Scott (1940) isolèrent, à partir d'une viande de bœuf avariée, une souche de *Clostridium novyi* qui poussait très bien à pH 6,8, moyennement à pH 5,8, et très peu à pH 5,5.

En vérité, ce comportement paraît être caractéristique de la plupart des bactéries de la viande : le développement de *E. coli* est très rapidement arrêté à un pH inférieur à 6,0 (Sherman et Holm, 1922), et *Cl. botulinum* ne pousse pas bien à des pH inférieurs à 5,4 (Dack, 1943).

L'effet d'une augmentation d'acidité est rendu encore plus difficile à interpréter du fait que, au fur et à mesure de leur développement, les bactéries alcalinisent la chair, et la multiplication des bactéries une fois commencée continue d'elle-même ; il s'ensuit que la fatigue augmentera beaucoup le développement consécutif des bactéries dans la chair des bêtes abattues et par là augmentera les chances de corruption. Puisqu'un grand nombre des espèces

citées sont des anaérobies facultatifs, il est probable que l'argument s'applique également aux aérobies qui se développent au voisinage de la surface.

On comprend que cette description ne s'applique qu'aux

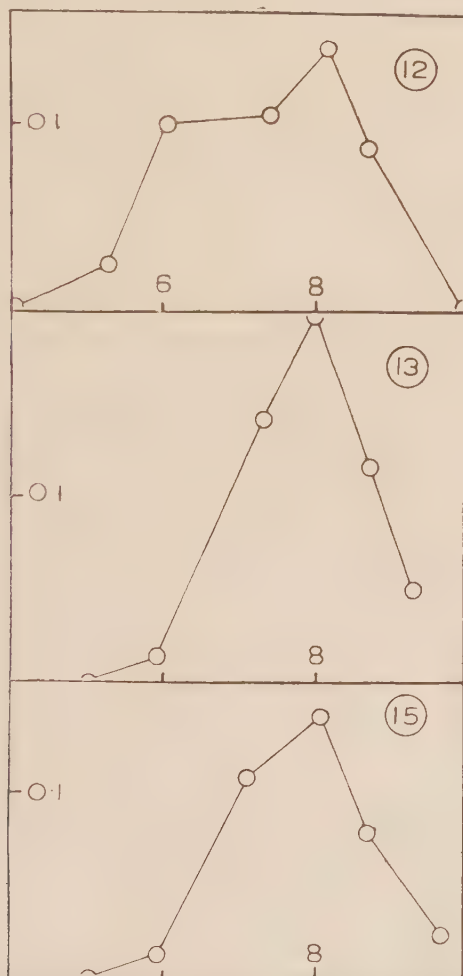


FIG. 4. — Influence du pH sur la vitesse de développement de trois bactéries isolées sur des jambons putréfiés.

muscles fatigués après une marche : par exemple, chez le porc, la fatigue modifie plus le pH du *grand psoas* que celui du *long dorsal* (Cf. tableau IV et Callow, 1938). Ainsi les muscles qui fonctionnent le plus sont les plus susceptibles de devenir des foyers

infectieux après la mort et il est intéressant de constater que les muscles de la face postérieure du genou semblent particulièrement atteints par l'exercice ; il est courant que la corruption commence autour de l'os, surtout près de l'articulation du genou (*Cf.* Haines et Scott, 1940). Si la viande doit être salée, l'élévation du pH a une conséquence importante, car elle empêche la pénétration du sel dont dépend la conservation (tableau V) :

TABLEAU V.

TRAITEMENT		(a)	(b)
I. Recouvert de sel pulvérisé la nuit à 0°.	r. e. (ohms).	517	1.710
	p. 100 NaCl.	4,73	4,43
II. Immergé dans l'eau salée 5 minutes à 20°.	r. e. (ohms).	370	1.540
	p. 100 NaCl.	2,4	2,0

La gamme de la concentration en sel du bacon et du jambon est normalement comprise entre 2,5 et 6,5 p. 100, mais il est probable, d'après le tableau V, qu'une faible part seulement de cette variation est directement due aux modifications du pH musculaire. A la limite inférieure (2,5 p. 100 de NaCl), toutes les bactéries résistantes poussent vigoureusement (comme on pouvait s'y attendre puisque les types moins résistants ont été éliminés).

Sur les 46 souches isolées, 17 seulement étaient stoppées dans leur développement par 6,5 p. 100 de NaCl (pH 7), tandis que 36 souches s'arrêtaient de pousser à pH 5,2 (sans NaCl). Il semble donc que cette action de l'acidité, en modifiant la concentration saline, soit bien moins importante que son action directe.

Toutefois, en examinant en détail les données, on constate un autre rapport intéressant entre les effets du pH et du sel (*Cf.* tableau VI). Le pH critique de tout organisme peut être considéré arbitrairement comme le pH auquel la vitesse de développement est réduite de 10 p. 100 de sa valeur optimale ; une concentration saline critique peut se définir de la même manière. Le tableau VI montre la fréquence à laquelle ces valeurs critiques ont lieu dans certaines zones.

Ce tableau montre (A) que, dans l'ensemble, les espèces qui résistent aux pH acides ne tolèrent pas le sel, et (B) que les espèces qui tolèrent le sel ne résistent pas à l'acidité.

Evidemment, ni l'acidité de la chair, ni le sel ajouté au cours du traitement n'agissent isolément ; le tableau VI montre clairement que ces deux facteurs, acidité et salaison, sont complémentaires à un degré élevé. Les organismes qui ont un pH critique plus acide que pH 5, et qui, pour cette raison se déve-

TABLEAU VI.

	A. ÉCHELLE DE pH			
	3,1-4,0	4,1-5,0	5,1-6,0	6,1-7,0
Nombre d'espèces à pH dans l'échelle ci-dessus.	1	7	31	31
Moyenne de la concentration de sel de ces espèces (p. 100)	5,0	6,9	8,2	11
	B. ÉCHELLE de la concentration de sel			
	0-5 p. 100	5-9 p. 100	10-15 p. 100	15 p. 100
Nombre d'espèces avec concentration de sel dans l'échelle ci-dessus.	11	14	14	7
Moyenne du pH de ces espèces (p.100)	5,1	5,4	5,6	6,0

loppent sur la viande, seront en général inhibés par des concentrations salines de l'ordre de celles du bacon et du jambon.

Une des espèces isolées est capable de supporter soit un pH de 5,0, soit 10 p. 100 de NaCl. Il est probable que de tels organismes pousseraient même sur du matériel provenant d'animaux ayant bien récupéré. A vrai dire, de tels jambons subissent la putréfaction dans une proportion de 2 p. 100.

De plus, les effets des variations de pH et de salaison ont été étudiés séparément, mais il y a tout lieu de croire que leur action combinée est plus importante.

Pour conclure, la chair musculaire des porcs fatigués avant l'abatage a un pH plus élevé et une résistance électrique augmentée par rapport à celle des animaux non soumis à la fatigue musculaire. Cette élévation de pH gêne la pénétration du sel dans la chair musculaire et ces deux faits sont la cause de la pullulation des bactéries aérobies ou anaérobies qui produisent la putréfaction.

BIBLIOGRAPHIE

- BATE-SMITH (E. C.). *Annual Rep. Food Investigation Board*, 1936, 22 ; 1937, (a) 15, (b) 24, (c) 44 ; *J. Physiol.*, 1938, 92, 336 ; *Advances in Food Research*, 1947, 1 (sous presse).
- CALLOW (E. H.). *Annual Rep. Food Investigation Board*, 1935, 61 ; 1936, (a) 76, (b) 78, (c) 79, (d) 80 ; 1937, (a) 49, (b) 50 ; 1938, 54.

- CALLOW (E. H.), INGRAM (M.) et HAWTHORNE (J. R.). *Annual Rep. Food Investigation Board*, 1939, 4 (sous presse).
- DACK (G. M.). *Food Poisoning* (Univ. Chicago Press), 1943, 53.
- HAINES (R. B.). *Microbiology in the Preservation of Animal Tissues* (H. M. Stationery Office, London), 1937, 5.
- HAINES (R. B.) et SCOTT (W. J.). *J. Hyg.*, 1940, **40**, 154.
- MADSEN (J.) *Nord Jordbruksforskning*, 1943, **5-6**, 340.
- SHERMAN (G.-M.) et HOLM (J.-E.). *J. Bact.*, 1922, **7**, 465.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DE MYXOMYCÈTES

par JOHANNA C. SOBELS (*).

(Institut Pasteur. Service de Pathologie végétale et de Mycologie.)

INTRODUCTION.

En 1907, Pinoy [7], le premier, montra qu'il était possible à certaines *Acrasiaz* de parcourir leur cycle normal d'évolution en association avec une bactérie spécifique. Raper [8, 9], en 1937-1939, dans un travail complet sur les *Acrasiaz*, aboutit aux mêmes conclusions. Cohen [4], en 1939, rapporte les résultats d'un travail original, qui lui a permis d'obtenir, d'une part, des cultures pures de différents myxomycètes, d'autre part des cultures de myxomycètes en association avec un organisme choisi (levure). Cet auteur conserve facilement ce qu'il appelle ses « two membered cultures » sur milieu aux flocons d'avoine. En utilisant la technique préconisée par Cohen, nous avons obtenu des cultures associées de *Licea fuxuosa* avec des levures vivantes, et également des cultures pures, soit en présence de levures tuées, soit même sur un extrait alcoolique de levure [40]. Une bourse offerte par le Gouvernement français nous a permis de reprendre les recherches sur la nutrition des myxomycètes, recherches qui s'étaient trouvées interrompues par la destruction de notre culture à la suite de circonstances malheureuses (1).

LA CULTURE DES MYXOMYCÈTES RECUEILLIS DANS LA NATURE.

1° CULTURES SAUVAGES (2). — Nous avons obtenu des cultures sauvages des différents plasmodes recueillis dans la nature en les

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 juin 1948.

(1) Nous tenons ici à adresser nos plus sincères remerciements à MM. Magrou et Lwoff, chefs de Service à l'Institut Pasteur, pour l'appui qu'ils ont bien voulu nous apporter dans nos travaux.

En particulier, notre reconnaissance va à M. le professeur J. Magrou pour la bienveillante hospitalité qu'il a bien voulu nous accorder, ainsi que pour les nombreux avis éclairés qu'il nous a largement dispensés.

Nous avons également été très sensible à l'amical accueil que nous ont réservé tous les collaborateurs de M. le professeur Magrou.

(2) Tous les plasmodes sont cultivés à la température du laboratoire ($\pm 20^\circ$) à l'abri de la lumière du jour.

cultivant dans des cristallisoirs sur un milieu organique (bois pourri et papier filtre arrosé avec de l'eau de robinet stérile ou une solution de Ringer diluée). Le fond du cristallisoir contient toujours une couche de liquide d'environ 5 à 10 mm. Le pH de ces cultures est voisin de 6. Environ chaque mois, lorsque le papier-filtre qui supporte le myxomycète prend une couleur brune, le plasmode, lavé à l'eau de robinet stérile est, dans le même cristallisoir, transplanté sur un papier-filtre neuf.

Comparée à l'élégante méthode de Mangenot [5, 6] (1932-1934), qui cultive ses plasmodes sur des disques de hêtre en les nourrissant avec des carpophores d'hyménomycètes dégradés par la décomposition ou par la cuisson, cette technique présente l'avantage de ne nécessiter que peu de temps pour l'entretien des cultures. Elle nous permet de conserver sûrement les souches de myxomycètes que nous utilisons. *Ceratiomyxa fruticulosa* fructifie d'ailleurs normalement dans ces conditions de culture.

2° CULTURES PURES. — Deux difficultés principales se présentaient dans nos essais de purification de *Badhamia utricularis*, *Fuligo spec.*, *Licea spec.*

a) S'il nous était relativement aisé d'éliminer les levures et autres champignons en utilisant la méthode de Cohen [4], il paraissait très difficile de débarrasser les cultures de certaines bactéries.

b) Les opérations de purification des myxomycètes nécessitent de nombreux repiquages sur des milieux particulièrement pauvres (eau bidistillée, tamponnée à pH 6 à l'aide des solutions de phosphates monopotassiques et disodiques de Sørensen et gélosée à 25 p. 100). Or, sur ces milieux pauvres, le plasmode perd rapidement sa vitalité, et il arrive fréquemment que l'on perde la culture lorsque les opérations de purification arrivent à leur terme.

Nous avons pu surmonter ces difficultés à la suite de nombreux tâtonnements et insuccès. Tout d'abord, il était indispensable d'éliminer les bactéries qui restaient présentes dans nos cultures. Pour obtenir des cultures pures d'amibes, certains auteurs ont essayé d'éliminer les organismes associés (bactéries) en faisant agir un produit antibactérien. Nous avons essayé d'utiliser cette technique pour la purification de nos myxomycètes en employant un sulfanilamide, le septoplax 1162 F, à différentes concentrations. Les résultats de ce premier essai furent totalement négatifs.

En faisant agir, non pas un antibactérien, tel le sulfanilamide, mais un mélange d'antibiotiques : pénicilline-streptomycine, nous avons pu, dernièrement, éliminer totalement les bactéries de cultures préalablement débarrassées des champignons, obtenant ainsi des cultures bactériologiquement pures. Employant la pénicilline seule ou en association avec d'autres antibiotiques, Loequin a pu, comme nous, opérer cette purification [4].

TECHNIQUE DE PURIFICATION DES CULTURES DE MYXOMYCÈTES.

Après un certain nombre (4-5) de repiquages sur gélose lavée, le plasmode est débarrassé de toutes les levures et autres champignons. Nous versons alors sur la plaque de gélose qui porte la culture un mélange de 10 U. O. de pénicilline et de 10 U. G. de streptomycine dans 10 cm³ d'eau bidistillée. Après un contact de vingt-quatre heures, ce liquide est enlevé, et le plasmode repiqué le jour suivant. Il est facile de constater la vitalité du plasmode avant le repiquage en observant son cheminement à la surface de la gélose. La pureté du myxomycète est vérifiée par une analyse bactériologique de ses traces sur le substrat. La première de ces difficultés étant ainsi tournée, nous devons éliminer la seconde en empêchant la mort du myxomycète par inanition au cours des repiquages de purification.

La méthode décrite ci-dessus permettant d'éliminer rapidement les bactéries associées au plasmode, a permis de restreindre sensiblement le nombre des passages nécessaires à l'obtention d'une culture pure. Malgré cela, le plasmode est toujours affaibli par son séjour sur le milieu pauvre, et il est indispensable de donner à la culture définitivement purifiée un aliment qui lui permette de recouvrer son entière vitalité : Cohen [4] préconisait, dans ce cas, l'utilisation de suspensions de levures, qu'il stérilisait à l'autoclave après les avoir lavées trois fois avec de l'eau stérile pour en éliminer les substances organiques du milieu.

Pourtant, la levure ainsi préparée ne paraissait pas convenir entièrement à nos cultures. Nous avons pensé que les lavages successifs des suspensions éliminaient des substances indispensables à la croissance des plasmodes. Nous avons donc utilisé des suspensions de levure stérilisées quinze à vingt minutes à 110° après une seule centrifugation.

Effectivement, les suspensions de levure obtenues par cette méthode étaient avidement consommées par les myxomycètes et permettaient la conservation indéfinie des cultures pures.

3° CULTURES ASSOCIÉES. — Partant de cultures pures de myxomycètes, il est souvent possible d'obtenir des cultures associées avec des organismes choisis (levures et bactéries) isolés à partir des traces de plasmodes sauvages. De telles cultures se repiquent aisément sur un milieu aux flocons d'avoine gélosé, ajusté à pH 6, où elles se développent abondamment [10]. En repiquant régulièrement ces cultures toutes les trois semaines environ, il est facile de les conserver pour les employer au fur et à mesure des besoins des expériences.

Lorsque des cultures mixtes de myxomycètes entretenues sur gélose aux flocons d'avoine sont repiquées sur de la gélose à l'eau

ajustée à pH 6. la surface de la plaque de milieu ne présente aucune colonie différenciée de l'organisme associé.

Pourtant, en ensemençant des traces du plasmode vivant en bouillon ordinaire et sur malt gélosé, on obtient une culture de microorganismes associés. Après la mort du plasmode, ceux-ci se développent tout d'abord sur le plasmode et, après quelque temps, dans les traces de celui-ci. Leur développement n'est pourtant jamais très abondant.

Le plasmode vivant inhibant également les colonies de champignons infectant fortuitement certaines de nos cultures, nous avons pensé qu'il produit des substances qui empêchent le développement des microorganismes associés et inhibent la croissance d'infections fortuites.

Nous avons, dans une précédente publication, relaté quelques observations sur ce sujet [11]. Nous rapportons ci-dessous le résultat de nouvelles expériences confirmant notre hypothèse.

ACTION INHIBITRICE D'EXTRAITS AQUEUX DES CULTURES DE MYXOMYCÈTES SUR LA CROISSANCE DE *Torulopsis*.

Nous avons utilisé, dans cette expérience, trois myxomycètes : *Badhamia utricularis*, *Fuligo* (2 espèces différentes) et deux *Torulopsis*, pris comme tests. L'un de ces *Torulopsis* est une levure pathogène pour l'homme et certains animaux de laboratoire (*T. histolytica*) [2, 3], qui, en association avec *B. utricularis*, avait donné une culture très riche de ce myxomycète.

L'autre est une nouvelle levure non pathogène (*T. laurentii*) que nous avons isolée des traces de *Licca flexuosa* [10] et qui donne également de très belles cultures lorsqu'elle est associée aux différents plasmodes.

Pour préparer les extraits aqueux, nous avons utilisé des cultures associées des myxomycètes sur gélose aux flocons d'avoine, prises au moment où le plasmode commence à monter sur la paroi de verre du vase de culture.

Dans chacun des flacons de culture, sont versés 10 cm³ d'eau de robinet stérilisée. Puis, après avoir détaché le plasmode des parois de verre, ces flacons sont laissés au repos pendant deux jours à la température du laboratoire. Le contenu des vases de culture est alors versé dans des tubes et centrifugé dix minutes à vitesse modérée.

Après centrifugation, on peut distinguer 3 couches :

Première : au fond du tube, le plasmode mélangé aux flocons d'avoine ;

Deuxième : Une couche visqueuse, opaque ;

Troisième : une couche liquide, transparente.

L'action inhibitrice de la zone 2, visqueuse, est expérimentée

sur *Torulopsis laurentii*, celle de la zone 3, plus liquide, sur *Torulopsis histolytica* et *T. laurentii*, en suivant la technique que voici :

Des tubes de gélose à 0,5 p. 100 d'extrait de malt, maintenus à 45°, sont ensemencés avec *T. histolytica* et *T. laurentii* dans des boîtes de Petri stériles. Au milieu de la plaque de gélose solidifiée, sont déposés délicatement des anneaux de Heatley et van Tieghem stérilisés au four à flamber.

On distribue stérilement dans chacun des anneaux de Heatley



FIG. 1. — Action d'un extrait aqueux d'une culture de *Fuligo* sur le développement de *Torulopsis histolytica*; rayon de la zone inhibée : 4 mm.

V à VI gouttes du liquide provenant de la couche supérieure, et dans chacun des anneaux de van Tieghem, à peu près 1,5 cm³ du produit de la couche visqueuse.

Les boîtes de Petri ainsi préparées sont placées dans un endroit frais pendant quarante-huit heures pour permettre la diffusion de la substance active dans la plaque et ensuite portées à l'étuve à 37°.

Les résultats mentionnés ci-dessous ont été observés : dans le cas de *T. histolytica*, après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 37° (température optima, 37°); dans le cas de *T. laurentii*, après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 37° com-

EXTRAITS AQUEUX Le plasmode et son milieu	COUCHE LIQUIDE (3°) Anneaux de Heatley : rayon de la zone inhibée	
Test, <i>Torulopsis histolytica</i> :		
1. <i>Badhamia utricularis</i>	0 mm. (1).	
2. <i>Fuligo spec.</i>	1 mm. (1).	
3. <i>Fuligo spec.</i>	4 mm. (1) [fig. 1].	
4. <i>Badhamia utricularis</i> (3).	1 mm. (1).	
5. Témoin (eau stérile).	0 mm. (2).	
EXTRAITS AQUEUX Le plasmode et son milieu de flocons d'avoine	COUCHE liquide (3°) Anneaux de Heatley : rayon de la zone inhibée	COUCHE visqueuse (2°) Anneau de van Thieghem : rayon de la zone inhibée
Test, <i>Torulopsis laurentii</i> :		
1. <i>Badhamia utricularis</i>	15 mm. (1).	15 mm. (1).
2. <i>Fuligo spec.</i>	30-35 mm. (1) [fig. 2].	20 mm. (1).
3. <i>Fuligo spec.</i>	16 mm. (1).	Non exp.
4. Témoin (extrait de flocons d'avoine).	0 mm. (2) [fig. 3].	Non exp.
(1) Pas de colonies à l'intérieur de l'anneau. (2) Colonies à l'intérieur de l'anneau. (3) Extrait aqueux de plasmode, broyé pendant 50 minutes dans un mortier avec du sable, et centrifugé pendant 10 minutes à grande vitesse; l'expérience est exécutée avec la couche supérieure.		

plété par un séjour de quarante-huit heures à la température du laboratoire (température optima, 20°).

Les résultats plus nets obtenus avec les différents extraits sur *T. laurentii*, par rapport à ceux obtenus avec *T. histolytica*, sont probablement en relation avec les faits suivants :

1° Si la croissance de *T. laurentii* a été empêchée par son séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 37°, au contraire, la diffusion des substances actives a pu être favorisée par la température plus élevée.

2° Le temps de diffusion fut de cinq jours dans le cas de *T. laurentii*, et de trois jours seulement dans le cas de *T. histolytica*.

En conclusion, il nous paraît certain que, non seulement l'extrait de plasmode de ces myxomycètes [41], mais aussi l'extrait de plasmode et le milieu qui le porte contiennent une substance qui empêche la croissance de *Torulopsis histolytica* et *T. laurentii*.

Nous pensons, à ce sujet, qu'il est permis de supposer qu'il s'agit là d'une propriété générale de tous les myxomycètes, propriété qui peut leur être utile dans leurs conditions naturelles.



FIG. 2. — Action d'un extrait aqueux d'une culture de *Fuligo* sur le développement de *Torulopsis laurentii*; rayon de la zone inhibée : 30-35 mm.



FIG. 3. — Action d'un extrait aqueux de flocons d'avoine sur *Torulopsis laurentii*; pas de zone inhibée. (Témoin.)

Cette substance, qui diffuse lentement, ne filtre pas à travers les bougies Chamberland (le filtrat recueilli est inactif). Elle est thermolabile, ce qui ne permet pas la stérilisation des extraits par la chaleur. Elle supporte bien un rayonnement ultra-violet d'une durée de dix minutes.

Indépendamment de nous, Locquin [4] a constaté la présence, chez plusieurs espèces de myxomycètes, de substances antibiotiques qu'il a pu, dans certains cas, extraire et purifier. Ces substances ont été trouvées dans les plasmodes morts ou vivants, les sporanges et le milieu de culture.

RÉSUMÉ

1° Nous avons obtenu des cultures sauvages des différents plasmodes recueillis dans la nature en les cultivant dans des cristallisoirs sur un milieu organique. Cette technique nous permet de conserver les souches de myxomycètes, que nous utilisons.

2° Pour obtenir des cultures pures nous avons complété la technique de Cohen :

a) Après un certain nombre (4-5) de repiquages sur gélose lavée, le plasmode se trouve débarrassé de tous les champignons. En faisant agir un mélange de pénicilline-streptomycine nous avons pu éliminer totalement les bactéries.

b) Nous avons nourri nos plasmodes ainsi purifiés avec des suspensions de levures non lavées, stérilisées (quinze minutes à 110°) après une seule centrifugation.

Des lavages répétés (trois fois) des suspensions de levures avec de l'eau stérile, tels qu'ils ont été préconisés par Cohen, ne conviennent pas à nos cultures. Ces lavages successifs éliminent des substances indispensables à la croissance des plasmodes.

3° Partant de cultures bactériologiquement pures, il est possible d'obtenir des cultures mixtes avec des organismes choisis. En les repiquant sur flocons d'avoine gélosés toutes les trois semaines, il est facile de les conserver.

4° Le plasmode des myxomycètes produit des substances qui empêchent le développement des microorganismes associés et inhibent l'envahissement accidentel par des champignons.

L'extrait de plasmodes de myxomycètes et probablement aussi le milieu, contiennent une substance qui empêche la croissance de *Torulopsis histolytica* et *Torulopsis laurentii*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COHEN (A.-L.). *Bot. Gaz.*, 1939, **101**, 243.
- [2] SEGRETAINE (G.) et DROUHET (E.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **221**, 1783.
- [3] SEGRETAINE et DROUHET (E.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 1161.

- [4] LOCQUIN (M.). *Recherches inédites sur les myxomycètes* (sous presse).
- [5] MANGENOT (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 907.
- [6] MANGENOT (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 936.
- [7] PINOY (E.). *Ces Annales*, 1907, **21**, 622 et 686.
- [8] RAPER (K. B.). *J. Agricul. Res.*, 1937, **55**, 269.
- [9] RAPER (K. B.). *J. Agricul. Res.*, 1939, **58**, 157.
- [10] SOBELS (J. C.). *Proceed. Kon. Nederl. Akad. Wetenschappen*, 1947, **50**, 521.
- [11] SOBELS (J. C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 1030.

SUBSTANCES ZYGOGÈNES ET ANAZYGOGENES POUR LE CILIÉ *GLAUCOMA SCINTILLANS*

par MANFRED SECKBACH (*).

(Institut Pasteur. Service de Physiologie microbienne.)

Les recherches de E. et M. Chatton ont montré qu'il est toujours possible de provoquer la conjugaison du cilié *Glaucoma scintillans*, en réunissant 4 conditions essentielles :

1° la privation d'aliment, qui est efficace, même lorsqu'elle ne s'établit que progressivement ;

2° l'intervention d'un facteur zygotène plus ou moins spécifique, organique ou inorganique ;

3° une limite supérieure de pH à 7,23 ;

4° un délai de douze à vingt-quatre heures ;

et cela, en l'absence des conditions maupasienne de sénescence et d'ascendance hétérogène.

La conjugaison paraissait donc, d'après les conclusions mêmes de E. et M. Chatton, comme déterminée par les conditions de milieu.

Nous avons repris l'étude du déterminisme de la sexualité de *Glaucoma scintillans* en nous proposant de définir quelques-uns des facteurs trophiques susceptibles d'agir dans le déterminisme de la zygose. Mais, pour aborder ce problème, il était nécessaire d'obtenir la zygose dans des milieux chimiquement définis ou, tout au moins, aussi exactement définis que possible.

Au cours de ce travail, il est apparu qu'il était impossible d'obtenir la conjugaison dans un milieu synthétique ordinaire. Ceci nous a conduit à mettre en évidence l'action empêchante exercée par certains cations sur la conjugaison. Nous avons été également amené à étendre aux sels de baryum et de magnésium l'activité zygotène reconnue par E. et M. Chatton aux sels de fer et de calcium.

TECHNIQUE.

Nous avons utilisé la souche même de *Glaucoma scintillans* isolée par E. et M. Chatton, et qui est entretenue dans le service

(*) Boursier de la Direction des Relations culturelles, Ministère des Affaires étrangères.

de Physiologie microbienne de l'Institut Pasteur. L'entretien est fait sur des milieux au grain de blé : 1 à 3 grains de blé autoclavés vingt minutes à 120° dans 10 cm³ d'eau de robinet.

Divers milieux se sont montrés favorables, aussi bien pour le développement des cultures, que pour l'étude du déterminisme de la zygose.

Milieu A : décoction de foin. On recouvre 5 g. de foin avec 1 litre d'eau de robinet, et on porte à l'ébullition. On filtre sur papier. Le filtrat est dilué de 10 à 40 fois et réparti en tubes de 17 mm. de diamètre, à raison de 5 à 10 cm³ par tube.

Milieu B : Milieu au foie et à la muqueuse intestinale. Du foie de lapin ou de la muqueuse intestinale du même animal provenant d'un tube digestif préalablement lavé, sont mis en suspension, à raison de 2 à 15 g. de substance fraîche pour 1 litre d'eau de robinet. On répartit la suspension comme précédemment et on stérilise de la même façon.

Milieu C : Milieu au blé. On introduit de 1 à 3 grains de blé dans 10 cm³ d'eau de robinet et on stérilise comme précédemment.

Dans la décoction de foin, milieu A, le cilié ne se développe pas en l'absence de bactéries. Il se multiplie, par contre, si le milieu a été préalablementensemencé avec *Escherichia coli*. Dans les milieux B et C, la culture bactériologiquement pure se développe fort bien.

DÉCLENCHEMENT DE LA ZYGOSE. — Le milieu le plus favorable pour obtenir des conjugaisons est le milieu Censemencé avec une culture de *Escherichia coli*, souche II, de la collection du laboratoire. Les tubes destinés aux expériences sontensemencés avec IV à V gouttes d'une culture mixte *G. scintillans* + *E. coli*. On place les tubes à l'étuve à 20° C. Le développement maximum, dans ces conditions, est atteint après quatre à cinq jours. Il y a, à ce moment, 60.000 ciliés environ par centimètre cube. Si le pH de départ est égal ou inférieur à 6,8, on voit les premiers couples apparaître trois à quatre jours après l'ensemencement, c'est-à-dire un peu avant ce que E. et M. Chatton ont appelé « la crise culturale », définie par l'arrêt de la croissance, dû, pour la plus grande part, à la diminution de la nourriture. Si le pH, au moment de l'ensemencement, est plus élevé (6,8 à 7,6), il n'y a pas de zygose. Mais celle-ci peut être provoquée, si l'on ajoute, vingt-quatre heures avant la date présumée de la crise, l'une des substances zygogènes définies par E. et M. Chatton : glucose, acide pyruvique, Cl₂Ca, Cl₂Fe. Dans ces conditions, le rapport nombre de couples/nombre total des ciliés varie de 2 à 30 p. 100.

L'étude cytologique des infusoires nous a montré qu'il s'agit bien d'une conjugaison accompagnée de la division des macronuclei, de la formation de pronuclei mâles et femelles, suivie

d'une dégénérescence du macronucléus et de sa reconstitution subséquente.

ETUDE DE QUELQUES FACTEURS ZYGOGENES.

Pour obtenir des conditions identiques dans les divers tubes d'une même série, nous avons procédé de la manière suivante : 1 à 2 grains de blé sont autoclavés vingt minutes à 120° dans 200 cm³ d'eau de robinet (fiolle de 1 litre). La fiolle est ensemencée avec la culture pure mixte *G. scintillans* + *E. coli* et placée à l'étuve à 20°. Après quarante-huit heures, on répartit cette culture en tubes préalablement stérilisés (stérilisation à l'autoclave avec 1 goutte d'eau bidistillée).

Les divers tubes d'une même série se comportent d'une façon identique. Cette technique a été utilisée dans toutes nos expériences.

CONCENTRATION DES SUBSTANCES ZYGOGENES. — Nous avons déterminé les concentrations auxquelles sont actives les substances zygo-gènes identifiées par E. et M. Chatton. Nous avons, d'autre part, constaté l'activité zygo-gène d'autres substances. Celles-ci ont été ajoutées dans les tubes quarante-huit heures après l'ensemencement, juste après la répartition de la culture-mère en tubes. Le tableau I résume les résultats de nos essais.

TABLEAU I. — Substances zygo-gènes.

SUBSTANCES zygo-gènes ajoutées	CONCENTRATIONS zygo-gènes	ZYGOSE		CONCENTRATION toxique
		Intensité (1)	Durée (2)	
O	—	0	0	—
Glucose	M/800-M/400	++	3	M/200 (3)
A. pyruvique.	M/640-M/320	++	1	
Cl ₂ Ca.	M/1.000-M/25	+++	3	M/20
Cl ₂ Fe.	M/16.000-M/1.600	+	2	M/1.000
SO ₄ Mg.	M/1.000-M/50	++	3	
Cl ₂ Ba.	M/1.000-M/100	±	3	M/50

(1) 0, pas de zygo-se; ±, couples très rares; +, 2-5 p. 100 de couples; ++, 5-20 p. 100 de couples; +++, 20-30 p. 100 de couples.
 (2) Nombre de jours pendant lesquels des couples ont été observés dans la culture.
 (3) L'excès de glucose entraîne une acidification du milieu.

Nos expériences confirment donc les conclusions de E. et M. Chatton relatives à l'action zygo-gène du glucose, de l'acide pyruvique, des sels de calcium et de fer. Elles étendent la qualité zygo-gène aux sels de magnésium et de baryum. Elles apportent

enfin des précisions relatives aux concentrations zygo-gènes et mettent en évidence le fait que les concentrations zygo-gènes peuvent être de 15 à 20 fois inférieures aux concentrations toxiques.

ACTION DES DIVERS INHIBITEURS DU MÉTABOLISME. — Le déclenchement de la zygose étant lié à l'épuisement, ou, tout au moins à la raréfaction de la nourriture, nous avons tenté de voir si certains inhibiteurs du métabolisme ne seraient pas susceptibles de provoquer la conjugaison en présence de Cl_2Ca , M/200.

On peut distinguer, pour les diverses substances, une concentration toxique empêchant la croissance, une concentration ralentissant la croissance et, enfin, une concentration ne produisant pas d'effet apparent. On voit que le nitrure de sodium, le cyanure de potassium, le fluorure de sodium et le 2-4-dinitrophénol aux concentrations immédiatement inférieures aux doses toxiques, empêchent la conjugaison. Nous pouvons ajouter que, dans aucun cas, ces inhibiteurs n'ont provoqué la zygose dans des milieux non zygo-gènes.

TABLEAU II. — Action sur la zygose déclenchée par Cl_2Ca M/200 de certaines substances inhibitrices.

SUBSTANCES inhibitrices (1)	CONCENTRATION	EFFET sur la croissance	ZYGOSE
O	—	—	+++
N_3Na	M/10.000 M/20.000 M/50.000	T O O	O O +++
CNK	M/1.000 M/2.000	R O	O +++
FNa	M/1.500 M/5.000 M/10.000	T R O	O O +++
2,4-dinitrophénol . . .	M/10.000 M/20.000 M/50.000	T O O	O O +++

T, effet toxique sur la culture; O, sans effet; R, crise trophique retardée.
(1) =, introduites 24 h. avant la zygose.

SUBSTANCES ANAZYGOGÈNES. — Afin d'étudier la nature des éléments capables d'influencer de façon spécifique la zygose, nous

avons essayé d'obtenir la conjugaison dans des milieux chimiquement définis. Ces recherches ont été fort longues et pendant très longtemps décevantes. Nous avons tout d'abord essayé d'augmenter la concentration en phosphates. Mais les concentrations efficaces susceptibles d'empêcher l'acidification se sont révélées toxiques. Nous avons alors utilisé un tampon de $\text{CO}_2\text{NaH M/42-CO}_2$. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de couples, alors que dans le milieu non tamponné, la zygoose s'est manifestée normalement. Cette constatation, ainsi que beaucoup d'autres observations, nous ont conduit à envisager l'hypothèse que certaines substances pourraient empêcher la zygoose. Nous avons alors examiné l'influence de différents cations sur celle-ci.

Nous avons utilisé le milieu au grain de blé décrit ci-dessus. Vingt-quatre heures avant la date présumée de la crise, nous avons ajouté dans les tubes : 1° des substances zygotiques, 2° du chlorure de potassium à concentrations diverses. Les résultats sont résumés dans le tableau III. On voit que le chlorure de potassium M/33 et M/200 a diminué considérablement l'activité zygotique du chlorure de calcium M/330, que le chlorure de potassium M/33 et M/50 a supprimé l'activité zygotique du chlorure de calcium M/200 et M/100. Par contre, le chlorure de potassium M/100 et M/200 s'est montré dépourvu d'action. Le chlorure de potassium à concentration convenable a également supprimé l'activité zygotique du sulfate de magnésium et celle du glucose.

TABLEAU III. — Effet anazygotique des ions K^+ .

SUBSTANCES ZYGOTIQUES	ClK ajouté	ZYGOSE
Cl_2Ca M/330	M/33-M/200 O (témoin)	\pm ++
M/200-M/100. .	M/33-M/50 M/100-M/200 O (témoin)	0 +++ +++
SO_4Mg M/200-M/100. .	M/33-M/50 M/100-M/200 O (témoin)	0 ++ ++
Glucose M/800-M/400. .	M/33 M/50-M/200. O (témoin)	0 \pm ++

Voir explications des signes dans la légende du tableau 1.

Nous avons constaté aussi (les résultats ne sont pas donnés dans

ce tableau) que l'activité zygotène du chlorure de calcium M/200 est inhibée par ClLi M/50 et ClNa M/25. ClNa M/50 est dépourvu d'action. L'ion sodium est donc moins actif que les ions K^+ ou Li^+ . On connaît de nombreux exemples d'antagonisme entre les ions potassium et calcium. La mise en évidence d'une action antagoniste du potassium vis-à-vis de l'action zygotène du calcium paraît donc normale. Nous ignorons, pour le moment, aussi bien le mécanisme intime de l'action zygotène du calcium que le mécanisme de l'action anazygotène du potassium.

INDUCTION DE LA ZYGOSE DANS UN MILIEU SYNTHÉTIQUE. — Il ne semble pas que la zygoze ait été jusqu'ici obtenue dans les milieux synthétiques. Tous nos essais ont été négatifs jusqu'au moment où la constatation de l'effet anazygotène de certains cations nous a conduit à envisager l'hypothèse que l'absence de conjugaison pouvait lui être rapportée. Nous avons donc constitué un milieu synthétique relativement riche en cations bivalents et relativement pauvre en cations monovalents et en phosphate. Ce milieu a la constitution suivante :

$SO_4Mg. 7H_2O$	0,200 g.
Cl_2Ca	1,85 g.
$PO_4Na_2H. 2H_2O$	0,050 g.
$SO_4(NH_4)_2$	0,300 g.
$SO_4Fe. 7H_2O$	0,00025 g.
ClK	0,0-0,1 g.
Glucose	0,7 g.
Eau bidistillée	1.000 cm^3
CO_3NaH	0,5 g.

Le bicarbonate de sodium stérilisé à part par filtration, est ajouté stérilement au milieu autoclavé, et l'on fait barboter un mélange CO_2 -air de façon à obtenir un milieu de pH 6,7. Ce milieu était ensemencé avec 11 gouttes d'une culture mixte *G. scintillans* + *E. coli* dans un milieu au grain de blé. Dans ces conditions, nous avons observé régulièrement, au quatrième jour, de 20 à 30 p. 100 de couples.

Nous avons donné comme titre à ce paragraphe : « induction de la zygoze dans un milieu synthétique ». En fait, si le milieu de culture est bien synthétique et de constitution connue, l'ensemencement est réalisé à partir d'une culture en milieu au grain de blé. Dans notre milieu synthétique, il est impossible de repiquer *en série* une culture mixte *G. scintillans* + *E. coli*. Une ou plusieurs substances présentes dans l'extrait de grain de blé sont nécessaires au développement du cilié. La nature de ces substances n'a pas été définie. De toute façon, l'addition au milieu synthétique d'un extrait de son de blé favorise grandement la croissance des ciliés et la conjugaison. Mais nous tenons à insister sur le fait que la zygoze n'a lieu que dans un milieu salin pauvre

en cations monovalents et riche en cations bivalents. Il n'y a pas de conjugaison dans les milieux salins ordinaires pauvres en cations bivalents et riches en cations monovalents.

RÉSUMÉ

1° Nous avons confirmé les conclusions de E. et M. Chatton relatives au rôle des facteurs externes dans le déterminisme de la zygoose chez *Glaucoma scintillans*.

2° A la liste des cations zyogènes reconnus par ces auteurs, $Fe+++$ et $Ca++$, dont nous avons confirmé l'effet, nous avons ajouté les ions $Ba++$, $Mg++$.

3° Les ions $K+$, $Li+$ et $Na+$, à concentration suffisante, empêchent le déclenchement de la zygoose dû à l'action du chlorure de calcium ou du glucose.

4° La zygoose a pu être obtenue dans un milieu salin riche en ions bivalents et pauvre en ions monovalents.

BIBLIOGRAPHIE

- CHATTON (E. et M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1923, **176**, 1091-1093 et 1262-1265 ; *Ibid.*, 1925, **180**, 1137-1140 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 675-678 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1927, **185**, 400-403 ; *ibid.*, 1929, **188**, 1315-1318 ; *ibid.*, 1929, **189**, 59-62 ; *ibid.*, 1931, **193**, 206-209 ; *ibid.*, 1942, **214**, 849-851.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES À L'INSTITUT PASTEUR EN 1947

par J. R. BÉQUIGNON et Ch. VIALAT.

Ce rapport, établi suivant le plan fixé par la Conférence internationale de la Rage, concerne l'année 1947.

1° *Personnes traitées.*

484 personnes se sont présentées à la consultation du service des vaccinations antirabiques. Chez 212, le traitement a été jugé nécessaire.

2° *Méthode de traitement.*

La méthode employée est la méthode pastorienne.

Les moelles sont soumises à la dessiccation, en chambre noire à 22°, dans des flacons munis de deux tubulures fermées par de l'ouate ordinaire et dont le fond est garni de potasse caustique. Après deux, trois ou quatre jours de dessiccation, les moelles sont introduites dans des pots-bans contenant 20 cm³ de glycérine neutre à 30° Baumé et stérilisés à l'autoclave à 120°.

Ce procédé de conservation des moelles en glycérine, proposé par E. Roux en 1887 (1) et introduit dans la pratique par A. Calmette en 1891, est adopté, depuis 1911, à l'Institut Pasteur.

Les moelles ainsi traitées sont conservées à la glacière à +3°.

Elles ne sont plus utilisées pour la vaccination lorsqu'elles ont séjourné dix jours en glycérine.

Chaque jour, les sujets en traitement reçoivent 4 à 5 mm. de moelle desséchée et triturée dans 3 cm³ d'eau distillée stérile. Le traitement a une durée de quinze, dix-huit, vingt-et-un ou vingt-cinq jours, suivant la gravité des morsures.

*
* *

Le virus fixe actuellement utilisé représentait, le 31 décembre 1947, le 1.792^e passage de la souche employée lors de la création du service de vaccination antirabique rue d'Ulm.

Afin d'éviter l'infection possible des moelles, celles-ci sont extraites avant la mort des animaux, qui sont saignés dès que la paralysie est complète.

Le procédé d'extraction des moelles est celui décrit par Oshida.

(1) E. ROUX, *Ces Annales*, 1887, 1, 87.

*
* *

Formule du traitement d'après l'âge des moelles.

1 ^{er} jour	Moelle de 4 jours (3 cent. cubes).
2 ^e —	— 4 — —
3 ^e —	— 4 — —
4 ^e —	— 4 — —
5 ^e —	— 3 — —
6 ^e —	— 3 — —
7 ^e —	— 3 — —
8 ^e —	— 3 — —
9 ^e —	— 2 — —
10 ^e —	— 3 — —
11 ^e —	— 3 — —
12 ^e —	— 2 — —
13 ^e —	— 3 — —
14 ^e —	— 3 — —
15 ^e —	— 2 — —

16 ^e jour	Moelle de 3 jours (3 cent. cubes).
17 ^e —	— 3 — —
18 ^e —	— 2 — —

19 ^e jour	Moelle de 2 jours (3 cent. cubes).
20 ^e —	— 2 — —
21 ^e —	— 2 — —
22 ^e jour	— 2 — —
23 ^e —	— 2 — —
24 ^e —	— 2 — —
25 ^e —	— 2 — —

3^o Répartition des personnes traitées d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

France	204
Allemagne	3
Autriche	1
Bulgarie	1
Indes anglaises	2
Tunisie	1

4^o Répartition des personnes traitées suivant l'animal mordeur.

Chiens de propriétaires connus	94
Chiens errants	81
Chats de propriétaires connus	18
Chats errants	10
Rats	9

5^o Répartition des personnes traitées d'après les preuves de rage chez l'animal mordeur.

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été constatée

par le développement de la maladie chez des animaux inoculés avec le cerveau ou par un examen histologique.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Catégorie A.	1
Catégorie B.	3
Catégorie C.	208

Les névrxes de 110 animaux ont été examinés par le service des vaccinations antirabiques. Vingt et une fois les commémoratifs de la morsure de l'animal et l'examen histologique du système nerveux nous ont autorisés à arrêter le traitement chez les personnes mordues.

Les principes généraux qui ont dicté cette décision ont été rappelés dans un rapport précédent (2).

6° *Répartition des personnes traitées d'après les caractères de la morsure :*

Profondes	185
Superficielles	27

7° *Répartition des personnes traitées suivant que les vêtements ont été interposés ou non :*

Peau nue	151
Vêtements interposés	61

8° *Répartition des personnes traitées d'après le siège de la morsure (3) :*

Tête	22
Membres supérieurs	120
Tronc	5
Membres inférieurs.	65

9° *Répartition des personnes traitées d'après le nombre de jours écoulés entre la morsure et le traitement :*

0 à 4 jours	102
5 à 7 jours	47
8 à 14 jours	24
15 à 21 jours	25
Plus de 21 jours	14

10° *Autres renseignements :*

(2) R. BÉQUIGNON et Ch. VIALAT. *Ces Annales*, 1943, 69, 372.

(3) Quand il s'agit de morsures multiples, seul est indiqué le siège de la morsure la plus dangereuse.

Répartition des personnes traitées par départements :

Aisne	1	Maine-et-Loire	2
Allier	1	Marne	1
Alpes-Maritimes	1	Marne (Haute)	1
Ardennes	1	Mayenne	1
Aube	2	Meurthe-et-Moselle	1
Bouches-du-Rhône	1	Meuse	1
Calvados	2	Morbihan	1
Charente	1	Moselle	1
Côtes-du-Nord	1	Oise	4
Côte-d'Or	3	Puy-de-Dôme	5
Creuse	1	Rhin (Bas)	1
Doubs	1	Saône (Haute-)	4
Eure	5	Sarthe	1
Finistère	4	Seine { Paris	60
Garonne (Haute-)	3	Banlieue	43
Ille-et-Vilaine	3	Seine-Inférieure	3
Indre	3	Seine-et-Marne	2
Jura	1	Seine-et-Oise	21
Landes	2	Vienne	1
Loire-Inférieure	2	Vienne (Haute)	3
Loiret	1	Vosges	2
Lot	3	Yonne	1
Lot-et-Garonne	1		

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine.

ANNÉES	PERSONNES traitées	CATÉGORIE A	CATÉGORIE B	CATÉGORIE C	DÉCÈS	MORTALITÉ p. 100
1886	2 671	231	1 926	514	25	0,94
1887	1 770	357	1 156	257	14	0,79
1888	1 622	402	972	255	9	0,55
1889	1 830	346	1 187	297	7	0,38
1890	1 540	416	900	215	5	0,32
1891	1 559	324	915	320	4	0,25
1892	1 790	128	1 062	600	4	0,22
1893	1 648	132	1 008	508	6	0,36
1894	1 384	166	798	423	7	0,50
1895	1 520	122	949	449	5	0,38
1896	1 308	106	747	455	4	0,30
1897	1 529	150	918	461	6	0,39
1898	1 465	141	855	469	3	0,20
1899	1 614	152	1 099	363	4	0,25
1900	1 420	179	866	375	4	0,28
1901	1 321	174	785	362	5	0,38
1902	1 105	150	625	330	2	0,18
1903	628	116	224	288	2	0,32
1904	755	148	330	277	3	0,39
1905	727	166	306	255	3	0,41
1906	772	173	396	203	1	0,13
1907	786	135	384	267	3	0,38
1908	524	113	269	142	1	0,19
1909	467	84	210	173	1	0,21
1910	401	98	143	160	0	0,00

ANNÉES	PERSONNES traitées	CATÉGORIE A	CATÉGORIE B	CATÉGORIE C	DÉCÈS	MORTALITÉ p. 100
1911	342	76	114	152	1	0,29
1912	395	71	145	179	0	0,00
1913	330	73	113	144	0	0,00
1914	373	68	102	203	0	0,00
1915	654	87	301	266	1	0,15
1916	1.388	188	658	542	3	0,21
1917	1.543	216	848	479	4	0,26
1918	1.803	206	885	712	3	0,16
1919	1.813	231	920	662	3	0,16
1920	1.126	86	554	486	6	0,53
1921	998	64	412	522	1	0,10
1922	754	101	353	300	0	0,00
1923	727	90	363	274	0	0,00
1924	764	135	208	421	1	0,14
1925	782	110	316	356	0	0,00
1926	634	74	246	314	0	0,00
1927	639	78	281	280	0	0,00
1928	671	76	203	387	0	0,00
1929	542	49	231	262	0	0,00
1930	589	77	116	396	0	0,00
1931	531	49	212	270	0	0,00
1932	561	64	271	226	0	0,00
1933	443	41	122	280	0	0,00
1934	496	23	51	422	0	0,00
1935	510	18	42	450	0	0,00
1936	463	13	20	430	0	0,00
1937	454	2	18	434	0	0,00
1938	411	3	11	397	0	0,00
1939	411	2	14	395	0	0,00
1940	449	0	8	441	0	0,00
1941	214	1	0	213	0	0,00
1942	149	0	1	148	0	0,00
1943	131	0	0	131	0	0,00
1944	122	0	1	121	0	0,00
1945	179	0	2	177	0	0,00
1946	228	1	1	226	0	0,00
1947	212	1	3	208	0	0,00
Total général.	54.990	7.083	27.190	20.717	151	0,28

11° Mesures prises en vue de suivre l'évolution des cas traités pendant six mois au maximum.

Les médecins sont priés de nous tenir au courant des accidents qui pourraient se produire pendant les six mois qui suivent le traitement.

12° Accidents paralytiques : Néant.

13° Décès : Néant.

La statistique pour 1947 est donc ainsi établie :

Personnes traitées	212
Mort	0

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 1^{er} juillet 1948.

Présidence de M. MAGROU.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine : J'ai l'honneur de présenter à la Société l'ouvrage que vient de publier M. Paul Boquet, *Venins de serpents et antivenins* (1), dans lequel notre collègue rapporte les données récentes sur la constitution, le mode d'action des venins ainsi que l'immunité, naturelle ou acquise, à l'envenimation.

Le traité célèbre de A. Calmette et les travaux de M^{me} Phisalix restent des ouvrages fondamentaux sur les venins et l'envenimation, mais ils n'ont pas épuisé le sujet, et les recherches récentes d'ordre chimique, physico-chimique, immunologique, poursuivies dans différents laboratoires du monde, auxquelles M. Paul Boquet a apporté une participation originale, méritaient la mise au point qu'il nous donne aujourd'hui.

D'une agréable présentation, abondamment illustré, et bourré de références, ce livre constitue une œuvre attachante et pleine d'enseignements sur ces mélanges complexes de puissants enzymes que sont les venins. Aussi sera-t-il consulté avec profit non seulement par ceux qu'intéressent les serpents des différents continents du globe, mais encore par les physiologistes et les biochimistes, qui y trouveront matière à d'utiles spéculations.

(1) 1 vol., 157 pages. *Collection de l'Institut Pasteur*, Editions Médicales, Flammarion, Paris.

COMMUNICATIONS

**PREMIÈRES DONNÉES SUR LA PRODUCTION
D'UNE « STREPTOMYCINASE »
PAR CERTAINES SOUCHES MICROBIENNES**

par BERARD SUREAU, EMILE ARQUIE, FERNAND BOYER,
et M^{lle} MICHELINE SAVIARD.

Il y a un an nous avons eu l'occasion d'isoler chez une malade de l'hôpital Pasteur une souche de *B. pyocyanique* capable d'inhiber les cultures d'*Actinomyces griseus* ; il s'agissait d'une malade atteinte de méningite à *B. de Friedländer* et traitée par une association médicamenteuse énergique, comportant 12 g. d'adiazine, 2.000.000 unités de pénicilline et 2 g. de streptomycine par vingt-quatre heures ; en outre, elle recevait chaque jour 0,3 g. de streptomycine intrarachidienne. Après cinq jours de ce traitement, au moment où le liquide céphalo-rachidien redevenait stérile, on vit apparaître une nouvelle réaction méningée, cette fois due à un *B. pyocyanique*. Malgré la poursuite du traitement la malade devait mourir. Ce sont ces bacilles pyocyaniques, développés en présence de fortes concentrations de streptomycine, qui nous ont permis de mettre en évidence pour la première fois une « streptomycinase ».

Récemment, nous avons étudié un *entérocoque* possédant, de façon marquée, la même propriété. Par la suite, nous avons observé, pour deux souches d'*entérocoques* de collection, la même action sur le développement d'*A. griseus* :

Les filtrats des cultures de ces souches, tant le *B. pyocyanique* que l'*entérocoque*, sont capables, même à faible concentration d'inactiver la streptomycine. Nous pensons être là en présence d'un enzyme, que l'on pourrait dénommer « streptomycinase » et qui se définit par les caractères suivants :

1° *Spécificité*. — Ces filtrats inactivent la streptomycine ; ils restent sans action sur la pénicilline.

Nous avons vérifié par la méthode des « cups » en gélose cette spécificité. Tandis que dans les « cups » témoins la streptomycine donne respectivement, vis-à-vis du staphylocoque Oxford, des diamètres d'inhibition de :

Pour une solution à 100 unités	— 35 mm.
Pour une solution à 10 unités	— 24 mm.
Pour une solution à 1 unité	— 21 mm.

TABLEAU II. — Action des filtrats de culture de l'entérocoque sur la streptomycine.

de streptomycine	FILTRAT ENTÉROCOQUE													
	TÉMOINS													
	streptomycine		1/20 de cm ³		1/10 de cm ³		1/4 de cm ³		1/2 cm ³		1 cm ³		Témoins staphylo	
	24 heures	48 heures	24 heures	48 heures	24 heures	48 heures	24 heures	48 heures	24 heures	48 heures	24 heures	48 heures	24 heures	48 heures
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Ces dosages ont été effectués de la façon suivante :

A des tubes de 5 cm³ de peptone glucosée additionnés de doses variables de streptomycine on ajoute des filtrats d'entérocoque ou de *B. pyocyane* à différentes concentrations ; on ensemence avec une culture de vingt-quatre heures de staphylocoque Oxford (de façon à obtenir une concentration finale de 10⁻⁴). Des témoins montrent que les filtrats n'ont par eux-mêmes aucun pouvoir antibiotique, et qu'ils sont stériles.

PRÉPARATION DE LA STREPTOMYCINASE.

Les produits que nous avons étudiés ont été obtenus :

1° Soit en filtrant sur bougie Chamberland L₃ des cultures de sept à douze jours de *B. pyocyane* ou d'entérocoque.

2° Soit en filtrant sur bougie L₃ des cultures analogues, surensémençées avec des spores d'*Actinomyces*.

Nous nous proposons de poursuivre l'étude de cet enzyme. Cette note n'a d'autre but que de signaler nos premiers résultats ; nous n'avons pas encore rencontré dans la littérature, l'indication de faits analogues.

(Institut Pasteur.)

SUR L'ACCOUSTOMANCE DES GERMES A LA STREPTOMYCINE

par M^{lle} M. MOUSSET, M^{me} F. GRUMBACH et F. BOYER.

Dans une note antérieure (1) nous avons montré la facilité avec laquelle on parvient *in vitro* à accoutumer certains germes à la streptomycine.

Six passages successifs dans un milieu de plus en plus riche en streptomycine permettaient en vingt jours de rendre inefficaces des doses de streptomycine mille fois supérieures à la dose initiale inhibitrice.

Nous avons également observé que ces souches rendues ainsi résistantes *in vitro* manifestaient, chez la souris traitée à la streptomycine, la même indifférence à ce médicament.

Il nous a paru intéressant de reprendre l'étude de ces souches à résistance acquise afin d'observer leur comportement vis-à-vis de la streptomycine après un an de conservation, d'une part, à la glacière en milieu approprié, sans aucun repiquage, et d'autre part en leur faisant subir 6 passages sur souris.

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* sont résumés dans le tableau suivant :

MILIEU PEPTONE	DOSE	DOSE DE STREPTOMYCINE MERCK TOLÉRÉE		
		après	par les souches accoutumées	
glucosée.	initiale			
Ensemencement	inhibitrice	accoutumance		
microbien 10 ⁻²	en U/cm ³	de 20 jours en U/cm ³	conservées un an à la glacière sans repiquage	ayant subi 6 passages sur la souris en un an
Staphylocoque 133.	8	30.000	20	20
Streptocoque Dig. 7	20	20.000	La souche a perdu sa vitalité.	
Typhique Eberth I.	20	20.000	200	20.000
Friedländer Caroli.	50	30.000	30.000	
Colibacille Mono4.	20	20.000	200	2

Les essais *in vivo* ont confirmé les résultats obtenus *in vitro* : c'est ainsi que le streptocoque souche Dig. 7 qui, au bout d'un an, a conservé intégralement *in vitro* son pouvoir résistant à la streptomycine, résiste également *in vivo* à l'action antibiotique de la streptomycine. Le coli Monod a perdu totalement son accoutumance *in vitro* et *in vivo* ; et

(1) F. GRUMBACH, M. MOUSSET et F. BOYER, Ces Annales, 1947, 73, 929.

même aujourd'hui sa sensibilité à la streptomycine est plus grande qu'initialement.

Par contre, deux autres souches de colibacilles isolés des urines de deux malades traités à la streptomycine pour affection rénale, manifestent la même résistance à la streptomycine qu'au moment de leur isolement il y a plus d'un an. Ces deux souches ont été simplement conservées à la glacière sans aucun passage pendant cette année.

Nous citerons encore le cas du staphylocoque Londres qui n'a perdu que partiellement son accoutumance, comme le montre le tableau ci-contre.

	SENSIBILITÉ à la streptomycine en unités par cm ³
Souche initiale	2,5
Staphylocoque après 13 jours d'accoutumance . .	1 200
Staphylocoque accoutumé, conservé 18 mois en glacière sans passage	800

Il ressort de cette étude que certaines souches conservent leur accoutumance à la streptomycine et que d'autres la perdent après avoir ou non subi des passages, en milieu de culture ou sur l'animal, et ceci à l'intérieur d'un même groupe de germes. Nous nous proposons d'étudier ces faits sur un plus grand nombre de germes et de souches différentes de chaque germe.

ACTION DE LA PENICILLINASE *IN VIVO*

I. — TRAITEMENT PAR LA PÉNICILLINE DE SOURIS AYANT REÇU AU PRÉALABLE DES INJECTIONS DE PÉNICILLINASE ET INOCULÉES PAR LE STREPTOCOQUE

par F. BOYER, B. SUREAU et M^{lle} M. SAVIARD.

L'étude systématique de la pénicillinase nous a conduits à étudier l'action *in vivo* de cet enzyme, et à rechercher le comportement vis-à-vis de la pénicilline de souris préparées par des injections de pénicillinase et infectées avec une souche microbienne virulente.

Nous avons choisi pour notre expérimentation le streptocoque hémolytique Dig. 7. Nous avons procédé à 4 ordres d'expérimentation.

1° Lots témoins.

2° Souris recevant en même temps, dès l'inoculation, en deux injections sous-cutanées distinctes, pénicilline et pénicillinase.

3° Souris ayant reçu deux injections de pénicillinase à vingt-quatre heures d'intervalle, puis inoculées et traitées dix-huit heures après la seconde injection de pénicillinase.

4° Souris ayant reçu soixante-douze et quarante-huit heures avant l'inoculation et le traitement, deux injections sous-cutanées de pénicillinase.

1° LOTS TÉMOINS. — Toutes les souris ont été inoculées par voie péritonéale avec $1/2 \text{ cm}^3$ d'une dilution au $1/100.000$ dans le Tyrode d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon ascite de streptocoques hémolytiques Dig. 7.

a) *Témoins non traités.*

		LOTS TÉMOINS (Jours)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
a) Témoins non traités.	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
b) Témoins traités par $0,5 \text{ cm}^3$ de pénicillinase.	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
c) Témoins traités par : un mélange extemporané pénicilline + pénicillinase.	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
	+										
d) Témoins traités par la pénicilline (50 U. O. par jour) pendant 2 jours.	V		+								
	V		+								
	V		+								
	V		+								
	V		V	+							
	V		V	V	+						
	V		V	V	V						
	V		V	V	V						
	V		V	V	V	V					
	V		V	V	V	V	V	+	V	V	V

b) *Témoins traités* aussitôt après l'inoculation, puis douze heures plus tard, par 0,5 cm³ sous-cutané de *pénicilline* (1).

c) *Témoins traités* aussitôt après l'inoculation, puis douze heures plus tard par 0,5 cm³ chaque fois de *mélange extemporané* : pénicilline, 50 unités dans 0,5 cm³ d'eau physiologique, et pénicillinase 0,5 cm³.

d) *Témoins traités*, dès l'inoculation, par 50 unités de *pénicilline* en 2 injections sous-cutanées par jour pendant deux jours.

Il ressort du tableau ci-dessus que la pénicillinase ne possède pas en propre d'action antibactérienne, et que mélangée *in vitro* à la pénicilline en proportions convenables elle l'inactive aussitôt.

2° SOURIS TRAITÉES PAR DES INJECTIONS DISTINCTES DE PÉNICILLINE ET DE PÉNICILLINASE, DÈS L'INOCULATION. — Ces animaux reçoivent toutes les douze heures, pendant quarante-huit heures, d'une part 25 unités de pénicilline, d'autre part 0,5 cm³ de pénicillinase soit au total 100 unités de pénicilline et 2 cm³ de pénicillinase.

		JOURS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pénicilline 50 U. O. par jour en deux injections + pénicillinase 0,5 cm ³ deux fois par jour pendant 2 jours.	V	V									
	V	V	+								
	V	V	+								
	V	V	+								
	V	V	V	V	+						
	V	V	V	V	+						
	V	V	V	V	V	+					
	V	V	V	V	V	V	+				
	V	V	V	V	V	V	V	V	+		
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

Ce traitement se révèle, par comparaison au traitement des souris témoins d, (mené au cours de la même expérience) nettement plus efficace.

3° SOURIS PRÉPARÉES PAR DEUX INJECTIONS DE 0,5 cm³ CHAQUE FOIS DE PÉNICILLINASE, vingt-quatre heures et dix-huit heures avant l'inoculation, et traitées par 25 unités de pénicilline toutes les douze heures pendant quarante-huit heures.

(1) La pénicillinase employée dans les expériences rapportées est constituée par le filtrat d'une culture de huit jours de *Subtilis* Souche Ungar sur bouillon glucosé, dont 1/20 de cm³ inactive 20.000 unités de pénicilline.

		JOURS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,5 cm ³ de pénicillinase 48 et 24 heures avant inoculation.	}	V	V	+							
		V	V	+							
		V	V	+							
		V	V	V	+						
		V	V	V	V						
et		V	V	V	V	+					
50 U. O. pénicilline par jour en deux injections pendant 2 jours.	}	V	V	V	V	+	V	V	V	+	
		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

Cette expérience confirme la précédente et améliore encore le pourcentage des survies.

4° UN DERNIER LOT DE SOURIS, ENFIN, EST PRÉPARÉ SOIXANTE-DOUZE HEURES ET QUARANTE-HUIT HEURES AVANT L'INOCULATION PAR UNE INJECTION CHAQUE FOIS DE 0,5 cm³ DE PÉNICILLINASE. — Le traitement pénicilliné est le même que pour le lot précédent.

		JOURS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,5 cm ³ de pénicillinase 72 et 48 heures avant l'inoculation.	}	V	V	+							
		V	V	+							
		V	V	V	+						
		V	V	V	V	+					
		V	V	V	V	V	+				
25 U. O. de pénicilline toutes les 12 heures pendant 48 heures.	}	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

Nous avons voulu nous assurer que ces résultats sont effectivement liés à l'action de la pénicillinase et qu'ils sont sans rapport avec le bouillon qui lui sert de support. Pour ce faire, nous avons préparé d'autres souris en leur injectant, au lieu de pénicillinase, 0,5 cm³, soixante-douze et quarante-huit heures avant l'inoculation de bouillon glucosé provenant du même lot que celui qui avait servi àensemencer le *B. subtilis*. Non seulement cette préparation n'a pas amélioré le pourcentage des survies mais elle semble même, par la fatigue supplémentaire qu'elle impose à l'organisme, atténuer les effets de la pénicillinothérapie.

	JOURS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Souris préparées par l'injection	V	+								
de 0,5 cm ³ de bouillon glucosé	V	+								
72 et 48 heures	V	+								
avant l'inoculation.	V	V	+							
Traitement par 50 U. O.	V	V	+							
de pénicilline (en deux injections)	V	V	+							
par jour	V	V	+							
pendant deux jours.	V	V	V	+						
	V	V	V	+						

Dans les conditions de l'expérimentation, la préparation des animaux a permis de faire passer les survies (10 p. 100 avec le traitement pénicilliné seul) à 20, 30 et même 60 p. 100.

Nous avons reproduit ces expériences, avec des résultats analogues, en utilisant des pénicillinases d'origines différentes : pénicillinase du *B. subtilis* Ungar obtenue sur milieu de Sauton, pénicillinase du colibacille, pénicillinase lyophilisée Schenley de *B. cereus*.

DISCUSSION. — Ces résultats ne constituent que la première étape d'une série d'études que nous avons projetées sur le mode d'action de la pénicillinase.

Nous ne pouvons aujourd'hui que constater un fait, l'activation de la pénicilline par la pénicillinase, dans certaines conditions bien déterminées. Se produit-il un composé intermédiaire très actif ? Sommes-nous en présence d'anticorps antipénicillinase capables de détruire des facteurs « antipénicilline » naturels du sang ? L'augmentation du pourcentage des survies avec l'ancienneté de la préparation par la pénicillinase pourrait le laisser penser.

(Institut Pasteur.)

ACTION DE LA PÉNICILLINASE *IN VIVO*

II. — ÉTUDE DE LA CONCENTRATION DE LA PÉNICILLINE DANS LE SANG DE LAPINS AYANT REÇU DE LA PÉNICILLINASE

par B. SUREAU, F. BOYER et M^{lle} M. SAVIARD.

Les résultats obtenus avec la pénicillinase au cours de l'expérimentation sur souris nous ont incités à reprendre le problème sous un autre angle et à étudier, chez le lapin, le passage de la pénicilline dans le sang.

Chez certains animaux, nous avons essayé de détruire la pénicilline du sang par des injections de pénicillinase ; d'autres ont été préparés

TABLEAU I

EXPERIENCE DU 24 MARS 1946

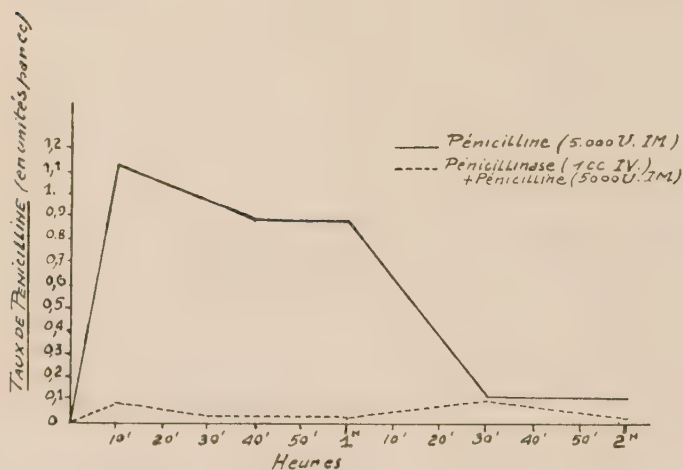
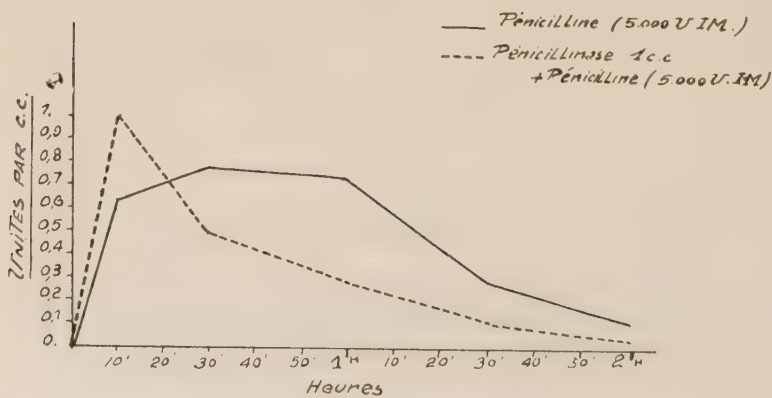


TABLEAU II

EXPERIENCE DU 18 MARS 48



par la pénicillinase, puis ont ensuite reçu un traitement par la pénicilline ; nous avons suivi le comportement dans le sang de cette pénicilline.

1° LAPINS TÉMOINS. — a) *Etude de la pénicillinémie*. Avant l'expérimentation, nous avons fait chez chacun de nos animaux une courbe

TABLEAU III

Expérience du 30 MARS 47

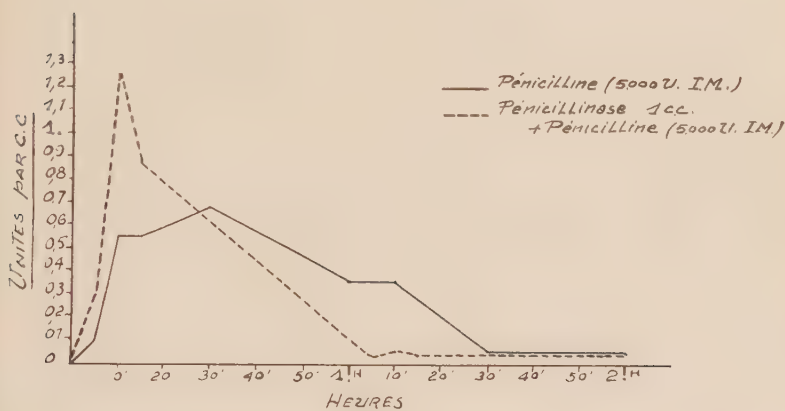
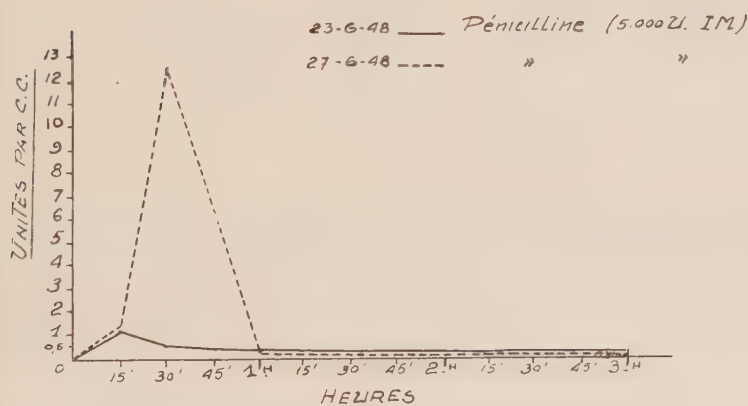


TABLEAU IV

Expérience du 23 JUIN 48



d'élimination sanguine de la pénicilline après un traitement intramusculaire de 5.000 unités de pénicilline (dans 1 cm³ de sérum physiologique) toutes les deux heures. Nous n'avons établi nos courbes qu'après un traitement d'au moins quatre heures.

b) *Lapins traités par des injections de pénicillinase seule* (1 cm³ de pénicillinase du *subtilis* Ungar par injection). — Ce traitement ne nous a jamais permis de relever dans le sang une activité antistaphylococcique mesurable.

c) A un lapin en cours de traitement par la pénicilline, nous injectons, en même temps que la pénicilline injectée dans le muscle, par voie veineuse, 1 cm³ de pénicillinase. La pénicilline du sang circulant est aussitôt et définitivement détruite ; le pouvoir bactériostatique du sérum s'équilibre aux environs de 0,03 unités Heatley, ce qui peut être considéré comme le pouvoir bactériostatique propre du sérum.

2° INJECTION INTRAMUSCULAIRE UNIQUE DE 1 CM³ DE PÉNICILLINASE AU COURS du traitement pénicilliné.

Les injections de pénicilline et de pénicillinase sont simultanées, l'une dans la cuisse droite, l'autre dans la cuisse gauche. Avant d'inactiver la pénicilline du sang circulant, la pénicillinase déclenche dans le sang l'apparition passagère d'une concentration élevée, dont le maximum dépasse nettement celui de la pénicillinémie témoin.

3° INJECTIONS INTRAMUSCULAIRES RÉPÉTÉES (1 cm³ toutes les demi-heures) de *pénicillinase* au cours du traitement pénicilliné.

Seule, la première injection entraîne l'apparition d'un clocher comparable à celui du tableau II. Le pouvoir bactériostatique du sérum est ensuite négligeable.

4° TRAITEMENT PAR LA PÉNICILLINE D'UN LAPIN PRÉPARÉ soixante-douze et quarante-huit heures auparavant, par une injection de 2 cm³ chaque fois de *pénicillinase*.

Après avoir établi une courbe d'élimination témoin, le lapin est préparé par la pénicillinase ; quarante-huit heures après la fin de cette préparation, il reçoit un nouveau traitement par la pénicilline.

Le phénomène signalé par nos premières expériences s'amplifie ; le maximum de concentration de pénicilline obtenue au bout de trente minutes est d'environ dix fois le maximum témoin.

*
* *

Nous poursuivons actuellement cette étude. Nous ne désirons aujourd'hui que signaler ces résultats expérimentaux.

(Institut Pasteur.)

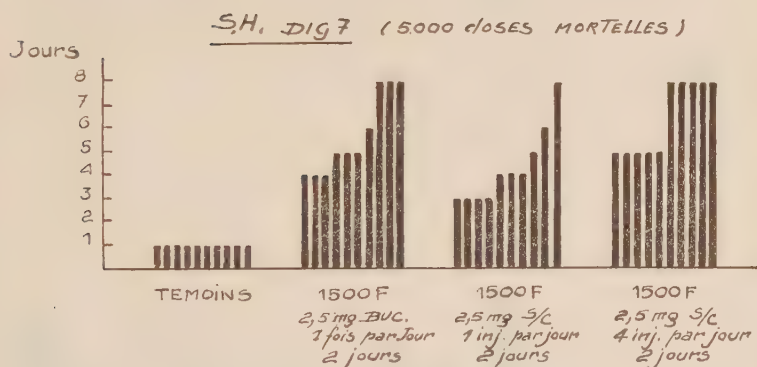
ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE « IN VIVO » DE L'ASSOCIATION « SULFONES-PÉNICILLINE » ET « SULFONES-STREPTOMYCINE »

par FERNAND BOYER.

Les associations médicamenteuses sont maintenant classiques ; déjà, en 1946, nous avons signalé, avec le Dr Nitti, l'intérêt de l'association « pénicilline-sulfamides » (1). Maintenant que les sulfones connaissent

TABLEAU I (2).

EXPÉRIENCE DU 13 Sept 47



un renouveau d'actualité, il nous a semblé utile de reprendre les études commencées avec le Dr Nitti et d'étendre aux sulfones les résultats prometteurs apportés par les autres associations médicamenteuses.

Nous avons entrepris l'étude d'une série de sulfones solubles dérivées de la para-diamino-diphényl-sulfone (1358 F), parmi lesquelles la 4-amino-4'-succinyl-amino-diphényl-sulfone (1500 F) retiendra aujourd'hui plus particulièrement notre attention. Cette sulfone, très soluble,

(1) F. NITTI, F. BOYER et M. FAGUET. Ces Annales, 1946, **72**, 687.

(2) Au cours de toutes ces expériences, les souris ont été infectées, par voie péritonéale (10.000 doses minima mortelles), avec une souche de streptocoques hémolytiques Dig. 7. Culture de vingt-quatre heures en bouillon ascite. Chaque colonne représente une souris ; la survie en jours est indiquée par la hauteur de la colonne.

se prête facilement à l'expérimentation, du fait qu'elle se mélange sans difficulté à la pénicilline ou à la streptomycine.

Toxicité du 1500 F. — Par voie intrapéritonéale, la dose maxima

TABLEAU II.

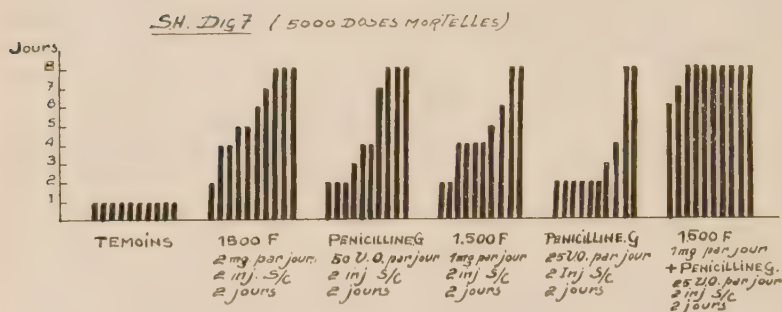
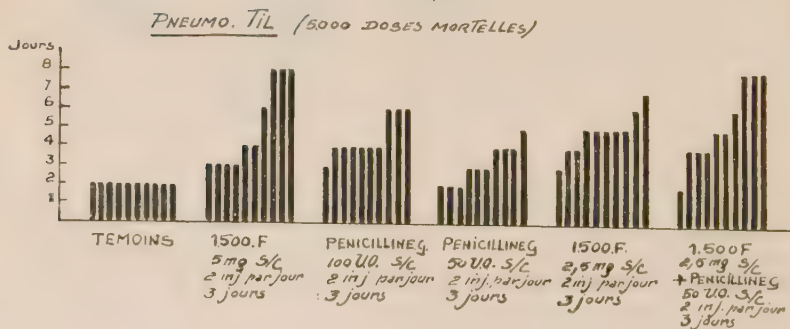
EXPERIENCE DU 10 DEC. 47

TABLEAU III.

EXPERIENCE DU 16 DEC 47

mortelle chez la souris est de 50 mg. pour une souris de 20 g. ; la dose tolérée sans trouble se situe aux environs de 10 mg.

Élimination. — Chez le lapin, après une injection sous-cutanée, la concentration maxima dans le sang est obtenue au bout d'une demi-heure ; après six heures, elle est pratiquement nulle ; l'élimination par les urines est totale en moins de vingt-quatre heures. Administrée

Smith et ses collaborateurs (3) ont étudié l'association « streptomycine-sulfones » vis-à-vis de la tuberculose expérimentale du cobaye.

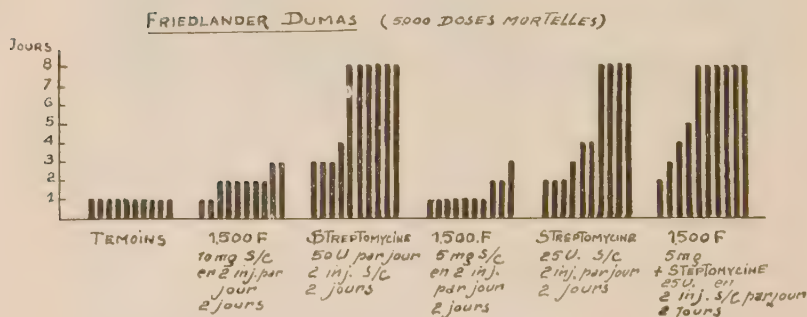
Association 1500-pénicilline. — Nos essais ont porté sur le streptocoque hémolytique Dig. 7 et le pneumocoque I, souche Til.

Comme le montrent les tableaux II et III, l'association ne se traduit pas seulement par une addition de l'activité antibactérienne des deux produits ; il y a une réelle synergie.

Association 1500-streptomycine. — Nos essais ont porté sur le streptocoque hémolytique Dig. 7, le pneumocoque I, souche Til et le Friedländer souche Dumas.

Il est intéressant de noter que les toxicités respectives des deux produits ne s'additionnent pas (une souris de 20 grammes supporte sans

TABLEAU VI.
EXPERIENCE DU 23 DEC. 47



troubles l'injection simultanée intrapéritonéale de 10 mg. de 1.500 et de 6.000 unités de streptomycine).

Les tableaux IV, V et VI confirment d'une façon encore plus nette la *synergie* des deux produits.

Nous avons, avec le 1368 F, administré par voie buccale du fait de sa faible solubilité, fait des essais analogues qui ont conduit aux mêmes conclusions.

Conclusions. — Il existe entre les sulfones, et en particulier, le 1500 F et le 1358 F, et la pénicilline ou la streptomycine, une synergie d'action.

L'association 1500-streptomycine nous paraît particulièrement intéressante ; ces deux produits, très actifs par eux-mêmes, sont relativement toxiques, mais leur administration simultanée entraîne une synergie de leur activité antimicrobienne sans que leurs toxicités s'ajoutent.

(Institut Pasteur.)

(3) M.-I. SMITH, W.-T. Mc CLOSKEY, E.-L. JACKSON et H. BAUER. *Proceed, Soc. exp. Biol. Med.*, 1947, 64.

PRÉPARATION DE SOUS-ÉTALONS STABLES POUR LES TITRAGES DE PÉNICILLINE

par P. BONÉT-MAURY et G. ODERBERG.

Le titrage d'une pénicilline comporte la préparation de sous-étalons de faible activité, de l'ordre de quelques unités Oxford. Le titre de ces étalons doit être connu avec une très bonne précision bien qu'il corresponde à une masse de pénicilline de quelques millièmes de milligrammes que l'on ne peut déterminer par pesée directe. On part donc généralement d'une quantité pondérable de pénicilline c'est-à-dire quelques dizaines de milligrammes (100.000 U. O. = 60 mg. de pénicilline G). La pesée précise de faibles masses d'un corps aussi hygroscopique que la pénicilline est une opération délicate ; la solution aqueuse de titre connu, préparée à partir de cette masse pesée, se conserve mal et il est nécessaire, pour chaque série de titrages, de préparer une solution étalon fraîche en sacrifiant quelques dizaines de milligrammes de pénicilline pour en utiliser finalement quelques millièmes de milligrammes.

On peut remédier à ces différents inconvénients en diluant la pénicilline dans une poudre inerte, à condition que le mélange soit de bonne conservation. Après plusieurs essais, nous avons constaté que le sulfate de magnésium cristallisé constitue, après pulvérisation, un bon excipient, chimiquement et biologiquement inactif aux doses utilisées pour un titrage de pénicilline ; la tendance du sel hydraté à s'« effleurir », c'est-à-dire à perdre spontanément une faible fraction de son eau de cristallisation lui confère des propriétés desséchantes convenables (1). Le sulfate de magnésie cristallisé ($\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) est soigneusement pulvérisé au mortier, après stérilisation si nécessaire (2). On introduit de petites quantités de sulfate pulvérisé dans un flacon de pénicilline G commerciale renfermant 100.000 U. O. et on mélange avec un agitateur. Ce mélange est vidé dans un mortier stérile où il est longuement trituré. On recommence l'opération avec de petites doses de sulfate de magnésium jusqu'à ce que toute la pénicilline du flacon ait été entraînée dans le mortier ; on ajoute alors du sulfate de magnésium en quantité déterminée pour obtenir le titre choisi (3). Le mélange est

(1) A l'air libre le sulfate cristallisé, pulvérisé, perd 6 p. 100 de son poids en huit jours, à 20°.

(2) Cette stérilisation peut être obtenue, soit en lavant les cristaux avec de l'alcool absolu saturé préalablement de sulfate de magnésium, soit en exposant la poudre aux vapeurs de formol en vase clos et en chassant ces vapeurs à la fin de l'opération par un courant d'air stérile.

(3) Nous utilisons un mélange renfermant 100.000 U. O. de pénicilline pour 10 g. de sulfate de magnésie pulvérisé ; la solution étalon de pénicilline est préparée en pesant 10 mg., soit 1.000 U. O., du mélange, que l'on dissout dans 10 cm³ d'eau pour obtenir une solution contenant 100 U. O. par centimètre cube.

alors titré par rapport à un étalon, par les méthodes classiques. Cette poudre *non hygroscopique* peut être pesée avec une grande précision sur une balance au dixième de milligramme ; sa conservation est excellente à la température du laboratoire, même dans un flacon simplement bouché par un tampon de coton lâche (tableau I).

Les fluctuations observées correspondent aux incertitudes habituelles du titrage de la pénicilline par les méthodes biologiques. La présence du sulfate de magnésium dans la solution de pénicilline n'a, aux doses

Conservation du mélange pénicilline-sulfate de magnésium.

DATE	TITRE EN U. O.	
	Méthode des dilutions	Méthode de Heatley
21 janvier 1948	100	100
24 février 1948	106	100
18 mars 1948	110	110
4 mai 1948	113	110
16 juin 1948	100	100
10 septembre 1948	100	100

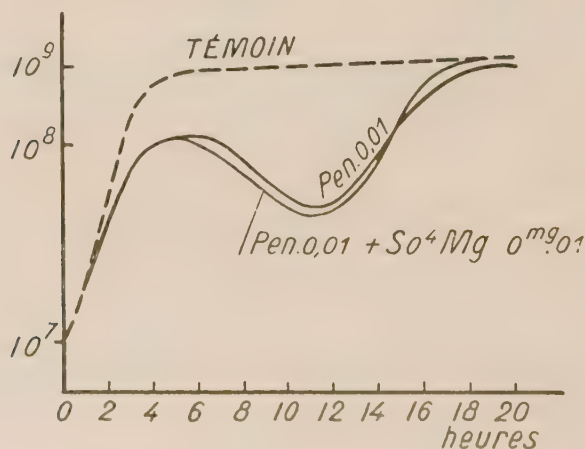


FIG. 1.

utilisées (10 mg. par centimètre cube pour 100 U. O./cm³), aucune influence sur les résultats du titrage, comme nous l'avons vérifié au cours de nombreux titrages et plus directement par la méthode de l'enregistrement photométrique. La figure I montre que les courbes obtenues avec ou sans sulfate de magnésium sont, pour une même concentration en pénicilline, pratiquement identiques, les légères différences observées

correspondant à des variations normales pour une même solution de pénicilline (4).

(Institut Alfred-Fournier,
Laboratoire de Biophysique et de Radiobiologie.)

ÉTUDE DU MODE D'ACTION DE LA PÉNICILLINE EN PRÉSENCE DU SUBTOSAN

par G. ODERBERG et P. BONET-MAURY.

Le subtosan, solution de polyvinylpyrrolidone à 25 p. 100, permet de retarder l'élimination d'un certain nombre de médicaments et notamment de la pénicilline, dont le nombre d'injections par vingt-quatre heures peut être abaissé à 2 ou 3 au lieu de 6 ou 8.

Nous avons cherché, par la méthode de l'enregistrement photomé-

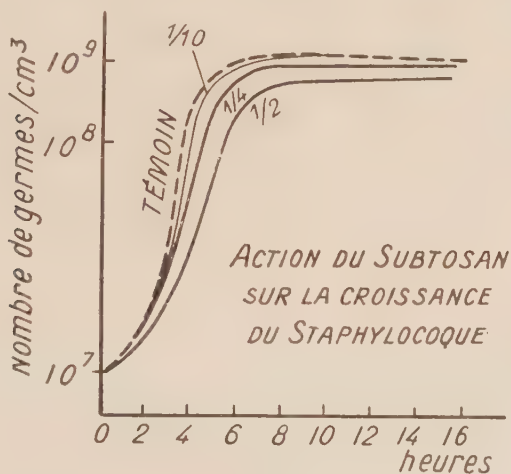


FIG. 1.

trique (1) si le subtosan avait, *in vitro*, une influence directe sur le mode d'action de la pénicilline. Le germe utilisé était le staphylocoque doré souche Oxford cultivé sur milieu Truche.

(4) On observe souvent, en répartissant un même milieu contenant pénicilline et staphylocoque dans différentes fioles du photomètre enregistreur, que les courbes enregistrées ne sont pas exactement superposables mais présentent de légères divergences, notamment à la fin de l'enregistrement ; ceci traduit, malgré des conditions apparemment identiques, des différences fioles, une certaine dissymétrie biologique peut-être due à de faibles différences dans la diffusion de l'oxygène au sein des suspensions bactériennes (Cf. R. PRAT et J. DUFRENOY, *Bact. Rev.*, 1948, **12**, 92).

(1) P. BONÉT-MAURY et R. WALEN. *Ces Annales*, 1945, **71**, 284 et *Cahiers de physique*, 1947, nos 29-30, 87.

En additionnant ce milieu de quantités croissantes de subtosan, on constate, en l'absence de pénicilline, une légère action retardatrice sur la croissance normale du staphylocoque lorsque la concentration en polyvinylpyrrolidone est égale ou supérieure à 2,5 p. 100 [10 p. 100 de subtosan] (fig. 1).

L'action de la pénicilline G est modifiée sensiblement par addition d'une concentration en subtosan égale à 10 p. 100, comme le montre

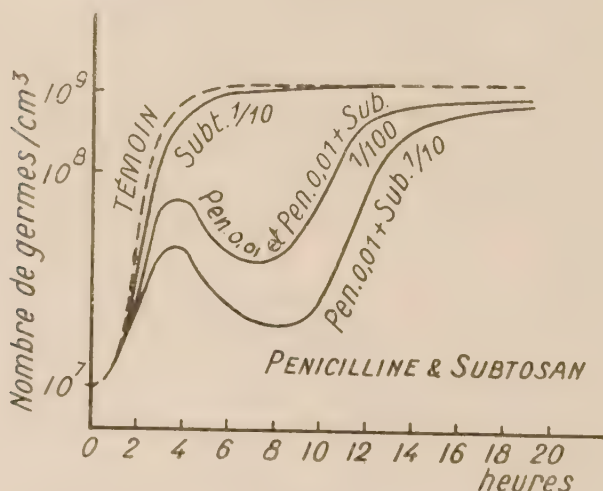


FIG. 2.

la figure 2 et, pour cette concentration, l'association pénicilline-subtosan manifeste une certaine synergie. Mais celle-ci disparaît pour les concentrations plus faibles en subtosan, par exemple 1 p. 100.

Comme la concentration en subtosan réalisée dans l'organisme après injection d'une solution de pénicilline-subtosan est très inférieure à 1 p. 100, il semble raisonnable de conclure que, aux doses thérapeutiques, le subtosan n'agit pas directement (2) sur la pénicilline, mais qu'il retarde seulement, par un mécanisme physiologique, son élimination.

(Institut Alfred Fournier. Laboratoire de Biophysique et Radiobiologie.)

(2) Certains auteurs supposent que l'action retardatrice serait due à la fixation de la pénicilline sur les grosses molécules de polyvinylpyrrolidone.

LES ERREURS DE MESURE DE LA PÉNICILLINÉMIE COMMENT Y REMÉDIER ?

par H. VELU et M^{lle} D. CHABANAS *

Un grand nombre de méthodes ont été proposées pour la mesure de la pénicillinémie. Elles sont basées sur la technique des dilutions et reposent sur l'emploi d'un étalon de titre donné, d'un bouillon de culture bien défini et d'un germe-test particulier, utilisés suivant une gamme établie par chaque auteur.

Pratiquement, le milieu diffère de celui préconisé surtout lorsqu'il n'est pas à base de produits standards, type Difco, par exemple ; le germe-test et sa concentration au centimètre cube varient suivant ce milieu et les conditions de la culture. La gamme proposée peut alors présenter des défauts : le seuil de l'étalon peut se déplacer et les erreurs de gamme (1) devenir considérables.

Prenons, par exemple, une gamme très simple, dérivée de celle de Sureau (2). Les volumes sont exprimés en 1/10 de centimètre cube et l'on ajoute uniformément dans chaque tube 0,5 cm³ de milieu de Sureauensemencé.

	NUMÉROS DES TUBES										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Étalon à 0,10 U/cm ³ ou											
échantillon à titrer.	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Eau.....	0	1	2	3	4	5	6	7	9	9	10

A la formule de Sureau pour le calcul du titre (rapport des dilutions), nous préférons celle qui exprime l'égalité des quantités de pénicilline dans le premier tube inhibé de l'étalon et le premier tube inhibé de l'échantillon (3), apportées sous des volumes variables v et v' , et à des concentrations différentes 0,10 et x U/cm³.

$$v \times 0,10 = v' \times x$$

d'où

$$x = \frac{v}{v'} \times 0,10$$

(*) Avec le concours technique de M^{me} ZAYGELBAUM.

(1) H. VELU et D. CHABANAS, ces *Annales*, 1947, 73, 1173.

(2) B. SUREAU, F. DEPIN et O. SCHURR, ces *Annales*, 1946, 72, 665.

(3) H. VELU et J. MAINIL, ces *Annales*, 1947, 73, 870.

S'il y a eu dilution de l'échantillon, son titre X sera :

$$X = x \times d.$$

Il est préférable, d'ailleurs, de prendre pour v et v' la moyenne entre le volume du premier tube inhibé et celui du premier tube non-inhibé.

Supposons que le tube-seuil de l'étalon soit le tube VIII. Nous en concluons que dans les conditions de l'expérience, l'inhibition de l'étalon a lieu pour :

$$\frac{(0,30 + 0,20)}{2} \times \frac{0,10}{1,5} = 0,166 \text{ U/cm}^3.$$

0,10 étant la concentration de l'étalon et 1,5 le volume de liquide dans les tubes de la réaction.

Si nous avons une série d'échantillons tels que chacun d'eux inhibe un tube de plus que le précédent, leur titre sera :

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
0,026	0,029	0,033	0,038	0,043	0,053	0,071	0,100	0,166	0,500	

On voit tout de suite :

1° Que la gamme est sensible à 0,026 U/cm³ (avant-dernier tube à gauche).

2° Que les échelons de la gamme ne sont pas égaux.

3° Que pour les échantillons dont le tube-seuil se trouve situé à gauche du tube-seuil de l'étalon (à gauche de VIII), les échelons sont petits, sensiblement égaux, et la sensibilité de la méthode convenable.

4° Que pour les tubes à droite de l'étalon, les échelons sont grands, très inégaux, et l'écart entre les titres tel, que l'exactitude de la méthode ne répond plus aux exigences de la clinique. Nous avons, à dessein, été jusqu'à la limite extrême, pour mieux souligner avec quelle prudence il convient de comparer les courbes de pénicillémie, surtout lorsqu'elles sont établies à partir des données fournies par une microméthode, et combien il serait désirable de voir adopter des techniques définies d'une façon rigoureuse pour la qualification des diverses formes pharmaceutiques, en particulier des pénicillines-retard.

En somme, lorsque le titre des échantillons est inférieur au titre de l'étalon, il est obtenu avec une précision suffisante pour la clinique ; lorsqu'il est supérieur, l'incertitude est d'autant plus grande qu'il est plus élevé et que la dilution est plus considérable. Alors, l'erreur, du point de vue clinique, n'est plus négligeable, même si l'on ne tient pas compte des données récentes apportées par Eagle (4) sur le phénomène de zone d'après lequel une dose donnée de pénicilline serait moins active aussi bien avec un nombre trop faible de germes qu'avec un nombre très élevé, et les doses trop élevées inutiles ou moins efficaces.

Mais le seuil de l'étalon n'est pas immuable. Il peut se déplacer sur la gamme dans un sens ou dans l'autre, suivant la richesse du milieu ou la concentration du germe-test.

Plus il sera à gauche, plus grands seront les échelons de gauche et

(4) H. EAGLE, *Science*, 1948, 407, 44.

plus étendue sera la gamme dont la sensibilité sera moindre et l'erreur plus grande, surtout pour les échantillons de titre élevé.

Plus il sera à droite, plus petits seront les échelons de gauche et plus réduite l'étendue de la gamme dont la sensibilité sera plus grande et l'erreur plus minime à gauche du seuil.

Est-il possible de remédier facilement à ces inconvénients ? La méthode proposée par Bonét-Maury (5) ne permet guère de faire des titrages en série parce qu'elle exige des mesures de volumes suivant un rythme peu commode.

Plusieurs moyens peuvent cependant être employés :

a) Il est tout d'abord facile de faire des dilutions des échantillons pour ramener leur concentration/cm³ à un titre inférieur à celui de l'étalon et placer ainsi leur seuil à gauche du seuil de l'étalon.

Si, par exemple, l'étalon est à 0,10 U/cm³ et inhibe avec 0,025 U/cm³, on diluera :

A 1/2,5 pour un titre supposé compris entre . .	0,06 et 0,25 U.
A 1/10 pour un titre supposé compris entre . .	0,25 et 1,0 U.
A 1/40 pour un titre supposé compris entre . .	1. et 4. U.

Cette méthode implique la nécessité de connaître approximativement l'ordre de grandeur du titre et de faire une ou plusieurs hypothèses ou de recommencer le titrage après une hypothèse unique, fausse.

b) On peut également modifier la gamme, en adoptant pour les tubes à droite de l'étalon, des volumes plus proches les uns des autres que pour ceux situés à gauche.

Un calcul simple montrera les volumes convenables à adopter ; ce sera, par exemple, pour le seuil et les conditions indiquées ci-dessus, les volumes suivants :

	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Volume en 1/10 de cm ³ . . .	3	2	1,6	1,2	1,0	0,9	0,8	0,7
Titres en U/cm ³ .	0,10	0,13	0,17	0,22	0,26	0,29	0,33	

Les intervalles ne seront pas égaux, mais donneront une approximation suffisante. Ainsi, un échantillon dilué au 1/10 et qui inhibera le tube X sera considéré comme titrant 5 U/cm³ avec la première gamme et 1,70 seulement avec la seconde.

c) Si le seuil de l'étalon se déplace trop vers la droite (inhibition pour des taux très faibles de pénicilline), il est possible de le ramener vers la gauche, soit en se servant d'un étalon moins concentré, soit en ensemençant des doses plus élevées du germe-test ou en employant un milieu plus riche. L'action de la pénicilline, contrairement à l'opinion première admise, n'est, en effet, pas indépendante du nombre des germes avec lesquels elle est mise en contact, comme l'a montré Lintz (6) pour le staphylocoque, Bouffanais et nous-même (7) pour

(5) P. BONNET-MAURY, ces *Annales*, 1946, 72, 966.

(6) R. LINTZ, *C. R. Soc. Biol.*, 1947, 141, 863.

(7) H. VELU et A. BOUFFANAI, ces *Annales*, 1948, 74, 253.

B. necrophorus et, plus récemment, Eagle, ainsi que nous l'avons signalé plus haut.

EN RÉSUMÉ. — 1° Les gammes de titrage proposées pour la mesure de la pénicillinémie comportent des erreurs de gamme qui sont loin d'être négligeables lorsque le titre de l'échantillon est supérieur à celui de l'étalon. On peut les supprimer, soit en adoptant des échelons différents de part et d'autre du seuil de l'étalon, soit, mieux encore, par des dilutions convenables des échantillons qui en ramènent le titre au-dessous du titre de l'étalon.

2° Le seuil d'inhibition de l'étalon peut se déplacer sur la gamme, en augmenter les erreurs et la rendre inutilisable. On peut y remédier en modifiant, suivant les cas, la concentration de l'étalon, la richesse du milieu ou le taux des germes-tests ensemencés. En un mot, les techniques de titrage de la pénicillinémie ne peuvent donner des résultats acceptables en clinique qu'à la seule condition de tenir compte des erreurs de gamme et de les éliminer par l'un des moyens que nous avons envisagés.

EXALTATION DE LA VIRULENCE DU VIRUS D'AUJESZKY PAR ASSOCIATION AVEC LE VIRUS HERPÉTIQUE

par P. LÉPINE et F. MARCENAC

Le virus de l'herpès et celui de la maladie d'Aujeszky présentent un certain nombre d'analogies, par leur neurotropisme, leur taille, leurs caractères physiques. Dans les neurones de l'encéphale, le virus de la pseudo-rage détermine des inclusions ayant avec celles du virus herpétique une étroite analogie [P. Lépine et V. Sautter (1)] et une même composition histo-chimique [P. Lépine et V. Sautter (2)].

Ces raisons nous ont fait rechercher, au cours d'expériences inspirées par des recherches sur les facteurs favorisant l'évolution neurotrope des virus, si le virus herpétique et le virus d'Aujeszky étaient capables d'interférence, c'est-à-dire de la faculté de protéger l'organisme infecté par l'un des virus contre une surinfection par le second du fait du blocage des récepteurs des cellules sensibles.

Nous avons constaté que, contrairement à cette hypothèse, l'association du virus herpétique et du virus d'Aujeszky renforçait considérablement la virulence de ce second virus.

Toutes nos expériences ont eu lieu sur des souris inoculées par voie intracérébrale.

Nous avons opéré, d'une part avec la souche d'herpès « Bruxelles » adaptée au névraxe de la souris : elle tue régulièrement cet animal entre le sixième et le septième jour après l'inoculation intracérébrale d'une dilution de 10^{-3} . Nous avons utilisé, d'autre part, la souche

(1) P. LÉPINE et V. SAUTTER, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **426**, 753.

(2) P. LÉPINE et V. SAUTTER, ces *Annales*, 1946, **72**, 175.

française de la maladie d'Aujesky [Cruveilhier, Truche et Viala (3)], virus normalement entretenu sur le lapin et que nous avons adapté à la souris. Sur cet animal, notre souche de virus se montre de faible virulence. L'inoculation intracérébrale d'une dilution au 1/20 tue 100 p. 100 des animaux en quarante-huit à soixante-douze heures ; à 10^{-2} , 93 p. 100 seulement des animaux succombent entre la soixante-douzième et la quatre-vingt-seizième heure, à 5.10^{-2} , il n'y a plus que 25 p. 100 de décès de la quatre-vingt-seizième à la cent-vingtième heure. Au delà de la dilution au 1/500, les animaux ne meurent plus ; notamment à 10^{-3} , la survie des animaux est quasi constante et la mort absolument exceptionnelle. Quel que soit le taux de dilution létale, les animaux présentent de fortes lésions de grattage sur la tête correspondant au point d'inoculation et, après la mort, une attitude empaillée tout à fait caractéristique de l'infection, ainsi facile à distinguer de l'infection herpétique qui, elle, évolue plus lentement dans le névraxe.

Dans ces conditions, si l'on injecte à la souris un mélange à parties égales de virus herpétique dilué à 10^{-3} et de virus d'Aujesky dilué à 5.10^{-3} (par conséquent normalement dépourvu de toute virulence pour l'animal), on constate qu'alors que tous les témoins inoculés avec du virus d'Aujesky survivent et que 4 sur 6 des témoins du virus herpétique succombent autour du septième jour, sur 12 souris inoculées avec le mélange, 4 souris meurent en soixante-douze heures, 2 en quatre-vingt-seize, 3 en cent-vingt heures. Toutes ces souris présentent de violentes lésions de grattage à la tête ; 3 souris succombent le sixième jour au virus herpétique. La seule présence du virus herpétique a suffi pour *augmenter de près de cinquante fois* la virulence de la souche d'Aujesky. Les seules souris ayant résisté au virus d'Aujesky ont succombé à l'infection herpétique.

Le même renforcement de la virulence s'observe plus paradoxalement encore si l'inoculation du virus herpétique est *postérieure* à celle du virus d'Aujesky. Un lot de souris reçoit par voie intracérébrale le virus d'Aujesky dilué à 10^{-3} et survit. Dans les jours suivants, les souris subissent une seconde inoculation du virus herpétique à 10^{-3} . Toutes les souris inoculées ainsi jusqu'au cinquième jour meurent de la quarante-huitième à la soixante-douzième heure avec des lésions typiques de grattage à la tête. A partir du septième jour, les souris succombent au virus herpétique après un délai de six à sept jours, sans lésion de grattage.

Réciproquement, quatre lots de 10 souris sont inoculées de virus à un taux subléthal de 10^{-4} , 2.10^{-4} , 5.10^{-4} et 10^{-5} respectivement et réinoculées soixante-douze heures après avec le virus d'Aujesky au taux L_{50} . Tous les témoins inoculés d'herpès survivent, mais les souris ayant reçu l'herpès à 10^{-4} et le virus d'Aujesky succombent à ce virus dans la proportion de 70 p. 100. Pour les dilutions supérieures de virus herpétique, le taux de décès est égal à celui des témoins. Il n'y a donc pas eu renforcement de la virulence du virus herpétique.

CONCLUSION. — L'association du virus herpétique au virus d'Aujesky exalte la virulence de ce dernier et détermine la mort des animaux par

(3) L. CRUVEILHIER, G. TRUCHE et C. VIALA, ces *Annales*, 1936, 56, 394.

la maladie d'Aujeszky à des taux d'inoculation normalement sans effet. Cette action s'observe, même si un délai de cinq jours sépare les deux infections. Par contre, il ne semble pas que la virulence du virus herpétique soit augmentée en présence de dilutions sublétales de virus d'Aujeszky.

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

Le Gérant : G. MASSON.